

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Patentschrift
⑯ DE 198 41 413 C 1

⑯ Int. Cl. 6:
C 07 K 14/435

C 07 K 16/00
C 12 N 15/11
C 12 N 15/12
C 07 H 21/04
C 12 N 15/79
C 12 N 15/85
C 12 N 5/10
C 12 Q 1/02

⑯ Aktenzeichen: 198 41 413.7-41
⑯ Anmeldetag: 6. 8. 98
⑯ Offenlegungstag: -
⑯ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 23. 9. 99

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:
Forschungsgesellschaft GENION m.b.H, 20149
Hamburg, DE

⑯ Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

⑯ Erfinder:
Netzer, Rainer, Dr., 22549 Hamburg, DE; Pongs,
Olaf, Prof. Dr., 20249 Hamburg, DE
⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
EMBO 15, 1996, S. 3322-3331;

⑯ Neuer spannungsabhängiger Kaliumkanal und seine Verwendung zur Entwicklung von Therapeutika

⑯ Gegenstand der Erfindung ist ein neues spannungsabhängiges Kaliumkanalprotein, Kv6.2 (SEQ ID NO: 1). Das Kv6.2 Gen wird präferentiell im Myocard und im Hippocampus exprimiert. In Verbindung mit der Untereinheit Kv2.1 werden neuartige funktionelle heteromultimere Kaliumkanäle ausgebildet, die eine hohe Affinität zu Propafenon besitzen. Erfindungsgemäß werden diese neuartigen Kaliumkanäle für Testsysteme verwendet, die geeignet sind, Stoffe zu identifizieren, die Kv2.1/Kv6.2 Kanäle modulieren, öffnen bzw. schließen können und damit als Therapeutika eingesetzt werden können.

DE 198 41 413 C 1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist ein neues spannungsabhängiges Kaliumkanalprotein, Kv6.2. (SEQ ID NO: 2 und 4). Ferner werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung erstmals heterologe Kaliumkanäle zur Verfügung gestellt, die das Kaliumkanalprotein sowie weitere Kaliumkanaluntereinheiten, wie z. B. das Kv2.1 Protein enthalten. Ferner sind erfundungsgemäß Vektoren eingeschlossen, die die Kaliumkanaluntereinheit Kv6.2 enthalten, sowie diese Vektoren enthaltende Wirtszellen, die die Kaliumkanaluntereinheit bzw. die Kaliumkanäle exprimieren. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner gegen die Kaliumkanaluntereinheit gerichtete Antikörper. Ferner wird erstmals ein Verfahren zum Identifizieren von Substanzen zur Verfügung gestellt, die Kaliumkanäle öffnen, schließen, aktivieren, inaktivieren oder 10 in ihren biophysikalischen Eigenschaften verändern können. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung dient das Verfahren zum Identifizieren bzw. Auffinden von Antiarrhythmika.

Die Membranen von Säugetierzellen sind für die strukturelle Integrität und die Aktivität von Zellen und Gewebe von großer Bedeutung. Eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen wird von Membran-durchspannenden Ionenkanälen gesteuert. In der Vergangenheit konnten verschiedene Ionenkanäle identifiziert werden, durch die Kalzium, Natrium und /oder 15 Kalium die Zellmembran passieren können.

Die Aktivität von Kaliumkanälen kann entweder durch intrazelluläre Signalstoffe wie cAMP oder durch Potentialdifferenzen an der Zellmembran reguliert werden. Diese Potentialdifferenzen oder Spannungen kommen durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle zustande.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind abhängig je nach des entlang der Zellmembran vorliegenden Potentials geöffnet oder geschlossen. Es sind verschiedene Klassen von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bekannt, deren Aufbau in der Regel ähnlich ist. Grundsätzlich bestehen sie aus vier homologen α -Untereinheiten und vier β -Untereinheiten. Die β -Untereinheiten sind für die Regulation der Aktivität des Kanals wichtig, während die α -Untereinheiten den eigentlichen funktionellen Kaliumkanal bilden (O. Pongs, Biospektrum 3 (1997) 21–26). Die α -Untereinheiten gehören zu einer gemeinsamen Gensuperfamilie. Sie besitzen eine vergleichbare zweidimensionale Struktur, aus der eine für Kaliumkanäle typische Membranopologie hervorgeht (O. Pongs, Physiol. Rev. 72 (1992) 69–88.; L.Y. Jan et al., Nature 371 (1994) 119–122; K.G. Chandy et al., in Handbook of Receptors and Channels ed. R.A. North, Boca Raton 1 (1994) 1–71). Jede α -Untereinheit besitzt sechs hydrophobe Membran-durchspannende Segmente S1–S6 und zwischen S5 und 20 S6 die sogenannte P-Region, die von der extrazellulären Seite in die Membran eintaucht. Die P-Region hat einen entscheidenden Anteil an der Ausbildung der Kaliumkanalpore. Das S4-Segment enthält mehrere Aminosäuren mit positiven Ladungen, die wahrscheinlich für die Spannungsempfindlichkeit des Kanals einen wesentlichen Beitrag liefern.

Die Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanaluntereinheiten lässt sich in mehrere Unterfamilien unterteilen, von denen die Kv1- bis Kv4-Familien gut charakterisiert sind (W. Stühmer et al., EMBO J. 8 (1989) 3235–3244; B. Albrecht et al., Receptor and Channel 1 (1993) 99–100; J. Rettig et al., EMBO J. 11 (1992) 2473–2486; Serodio et al., J. Neurophysiol. 75 (1996) 2174–2179). Innerhalb der Unterfamilien liegt die Sequenzidentität der einzelnen α -Untereinheiten 25 untereinander auf der Ebene der Aminosäuren bei $\geq 60\%$. Die bisher klonierten α -Untereinheiten der Familien Kv1 bis Kv4 exprimieren funktionelle Kaliumkanäle in heterologen Expressionssystemen, d. h. nach Injektion von DNA und mRNA in Xenopus Oozyten bzw. in Gewebekulturzellen (Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, Human Epithelial Kidney (HEK) 293 Zellen) oder nach Transfektion von Gewebekulturzellen mit für α -Untereinheiten kodierender DNA in geeigneten Expressionsvektoren wie pcDNA3 (s. u.).

Zusätzlich zu α -Untereinheiten von Kv1 bis Kv4 sind noch weitere potentielle Kv α -Untereinheiten bekannt (M.A. Post et al., FEBS 399 (1996) 177–182; J.P. Hugnot et al., EMBO 15 (1996) 3322–3331; A. Castellano et al., J. Neurosci. 17 (1997) 4652–4661; J.A. Drewe et al., J. Neurosci. 12 (1992) 538–548, die zu Kv1 bis Kv4 bezogen auf die Aminosäuren eine Sequenzidentität von $<60\%$ zeigen. Diese Kanäle wurden als Kv5.1, Kv6.1, Kv7.1, Kv8.1 bezeichnet. Hauptmerkmal dieser α -Untereinheiten ist, daß sie zwar für Kaliumkanal α -Untereinheiten typische Sequenzmerkmale 40 enthalten, aber als Homomultimere keine funktionellen Kanäle in heterologen Expressionssystemen ausbilden. Es ist aber möglich, daß diese α -Untereinheiten zusammen mit α -Untereinheiten der Kv2 Familie Heteromultimere ausbilden, die funktionell exprimierbar sind, d. h. funktionelle Kaliumkanäle bilden (M.A. Post et al. (a.a.O.); J.P. Hugnot et al. (a.a.O.); A. Castellano et al. (a.a.O.)).

Spannungsabhängige Kaliumkanäle können vielfältige physiologische Aufgaben übernehmen, die von der Regulation 45 des Membranruhepotentials bis hin zur Regulation der Exozytose und Zellproliferation reichen. In erregbaren Zellen haben spannungsabhängige Kaliumkanäle eine wichtige Bedeutung für die Repolarisation der Aktionspotentiale und die Regulation des Schwellenwertes, von dem aus ein Aktionspotential ausgelöst werden kann. Insofern steuert die Aktivität von Kaliumkanälen sowohl die Dauer und Verlaufsform des Aktionspotentials als auch die Aktionspotentialauslösungs-frequenz. Dies gilt auch für die rhythmische Erzeugung von Aktionspotentialen im Herzmuskelgewebe, dem Myocard 50 (R.E. Ten Eick et al., FASEB J. 6 (1992) 2568–2580).

Mehrere distinkte Kaliumkanaltypen sind an der Generierung und Repolarisierung der Aktionspotentiale im Myocard 55 beteiligt. Die von diesen Kanälen generierten Ströme werden als I_{TO} , I_{KR} und I_{SK} bezeichnet. I_{TO} ist ein schnell aktivierender transienter Kaliumauswärtsstrom, I_{KR} ist ein schnell aktivierender, nicht inaktivierender Kaliumauswärtsstrom, I_{SK} ist ein langsam aktivierender Kaliumauswärtsstrom. Diese Ströme wurden an dissozierten, in Kultur gehaltenen Myocardzellen gemessen (R.C. Kass und L.C. Freeman, Trends Cardiovasc. Med. 3 (1993) 149–159; D.M. Barry und J.M. Nerbonne, Ann. Rev. Physiol. 58 (1996) 363–394). Die Analyse von erblichen Herzrhythmusstörungen, die zu einem langen QT-Syndrom, d. h. einer verzögerten Repolarisierung des kardiakalen Aktionspotentials, führen, hat gezeigt, daß der I_{SK} -Strom im wesentlichen durch KvLQT1/Kv-Kanäle vermittelt wird (M.C. Sanguinetti et al., Nature 384 (1996) 80–83; J. Berhamin et al., Nature 384 (1996) 78–80). HERG/Kv-Kanäle vermitteln Ströme, die zur Nachhyperpolarisierung und damit zur Stabilisierung des Schwellenwertes beitragen (P.L. Smith et al., Nature 379 (1996) 833–836). Pharmakologisch ist es möglich, HERG-Kanäle relativ spezifisch durch Pharmaka wie E-4031 zu blockieren (P.S. Spector et al., Cir. Res. 78 (1996) 499–503). Vermutlich sind Kanäle des Typus Kv1.5 und Kv4.3 sowie die hier beschriebenen Kv2.1/Kv6.2 Kanäle an der Ausbildung des I_{TO} und I_{KR} beteiligt (vgl. R.C. Kass und L.C. Freeman, Trends

Cardiovasc. Med. 3 (1993) 149–159; D.M. Barry und J.M. Nerbonne, Ann. Rev. Physiol. 58 (1996) 363–394). Es ist noch nicht bekannt, welche und wieviele Kaliumkanäle insgesamt an der Repolarisierung des kardiakalen Aktionspotentials beteiligt sind.

Herzrhythmusstörungen werden gegenwärtig häufig mit Ionenkanalblockern behandelt. Die Wirkungsweise dieser Blocker läßt sich dahingehend klassifizieren, ob sie die Depolarisierungsgeschwindigkeit (Anstieg) des kardiakalen Aktionspotentials verzögern (z. B. Flecainid, Phenytoin) bzw. die Dauer des kardiakalen Aktionspotentials verlängern (z. B. Sotalol, Aminodaron, Chinidin, Disopyramid) oder aber die Dauer des kardiakalen Aktionspotentials verkürzen (z. B. Lidocain, Mexiletin). Ein wichtiges Präparat ist die Substanz Propafenon (Merck-Index XI 7806), die zu den Antiarrhythmika der Klasse 1c gezählt wird (H. Honjo et al. Br. J. Pharmacol. 97 (1989) 731–738). Propafenon wird bei symptomatischen und behandlungsbedürftigen tachykarden supraventrikulären Herzrhythmusstörungen, wie z. B. AV-junktionale Tachykardien, supraventrikuläre Tachykardien bei WPW-Syndrom oder paroxysmalem Vorhofflimmern und schwerwiegend symptomatische ventrikuläre tachykarde Herzrhythmusstörungen eingesetzt (J. Braun und R. Preuss. Klinikleitfaden der Intensivmedizin, 2. Auflage, Jung Johann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm/Stuttgart (1992)). Die Verabreichung von Propafenon führt, wie in einigen experimentellen Arbeiten beschrieben, nach einem Verschluß der Herzgefäße zu einer verbesserten metabolischen und funktionellen Erholung des Herzens (J.X. Liu et al. Eur. J. Pharmacol. 250/1 (1993) 361–369).

Für den Wirkungsmechanismus von Propafenon wird eine Blockade spannungsabhängiger Natrium-Kanäle angenommen. Propafenon blockiert zusätzlich den L-type Kalzium-Kanal, eine Reihe von Kalium-Kanälen und β -adrenerge Rezeptoren (A.O. Grant J. Cardiovasc. Elektrophysiol. 7 (1996) 353–364). Bei relativ hohen Konzentrationen sind Interaktionen mit den einzelnen Ionenkanälen und β -adrenergen Rezeptoren diskutiert worden (J.C. Hancox und J.S. Mitchell. Br. J. Pharmacol. 121 (1997) 7–14; B. Koller und M.R. Franz. J. Cardiovasc. Pharmacol. 24 (1994) 753–760; G. Malfatta et al. Eur. Heart J. 14 (1993) 1253–1257). Ein Kanal, für den Propafenon eine hohe Bindungsaffinität hat, ist im Stand der Technik jedoch nicht bekannt.

Propafenon weist jedoch den Nachteil auf, daß beim Patienten vorübergehend Kopfschmerzen, Schwindel, Augenflimmern oder Magen-Darm-Störungen auftreten können (J. Braun und R. Preuss. Klinikleitfaden Intensivmedizin, 2. Auflage, Jung Johann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm/Stuttgart (1992)). Bei älteren Patienten kommen häufig hypotone Kreislaufstörungen vor. Bei stark vorgeschädigtem Myokard können unerwünschte Beeinträchtigungen der Erregungsleitung im HIS-Purkinje-System und der Myokardkontraktilität auftreten (P. Vigreux et al. Therapie 50 (1995) 413–418; P.J. Podrid und J.L. Anderson. Am. J. Cardiol. 15 (1996) 430–434; E. Aliot und I. Denjoy. Am. J. Cardiol. 77 (1996) 66A–71A).

Aufgrund der Nebenwirkungen von Propafenon und anderen im Stand der Technik bekannten Antiarrhythmika wird ständig nach neuen Wirkstoffen gesucht. Das gezielte Screening nach neuen Antiarrhythmika erfolgt in der Pharma-Industrie bislang in der Regel mit Hilfe einer Langendorf-Apparatur. Dabei wird die Funktion eines isolierten Kaninchens- oder Mäuseherzens unter entweder einem konstanten Druck oder einem konstanten Fluß gemessen (A. von Bethmann et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153 (1996) A529).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein neues Testsystem (Assay) zur Verfügung zu stellen, das geeignet ist, Stoffe auf ihre Eignung als Antiarrhythmika zu testen, d. h. mit dem getestet werden kann, ob sich Wirkstoffe als Antiarrhythmika eignen. Insbesondere soll der Assay verwendet werden können, um auf einfache Weise gezielt Wirkstoffe daraufhin zu testen, ob sie die Modulation von I_{KR} -Strömen ermöglichen. Mit dem Testsystem sollen Pharmaka somit auf ihre Wirkung gegenüber I_{KR} -Strömen überprüft werden können. Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Testsystem zur Verfügung zu stellen, das den bislang notwendigen Einsatz der Langendorf-Apparatur überflüssig macht oder zumindest stark einschränkt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch Wirtszellen gelöst, die den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv2.1/Kv6.2 exprimieren.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird überraschenderweise eine neue Untereinheit eines Kaliumkanalproteins, Kv6.2, zur Verfügung gestellt, die in Verbindung mit Kv2.1-Untereinheiten nicht-inaktivierende Kaliumauswärtsströme vermittelt, die aufgrund ihrer Eigenschaften zu I_{KR} -Strömen beitragen können. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung zeigte es sich, daß die erfindungsgemäßen Kv2.1/Kv6.2-Kanäle hochsensitiv gegen das Klasse IC Herzantiarrhythmikum Propafenon sind. Die erfindungsgemäßen Kaliumkanäle eignen sich in besonderer Weise zur gezielten Identifizierung und Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von Erkrankungen des Herzkreislaufsystems und des Nervensystems in Mensch und Tier, insbesondere von Antiarrhythmika.

Das erfindungsgemäße humane Kaliumkanalprotein weist die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz auf.

Das erfindungsgemäße murine Kaliumkanalprotein weist die in SEQ ID NO: 4 gezeigte Aminosäuresequenz auf.

Erfindungsgemäß eingeschlossen sind auch Homologe, d. h., im Myocard exprimierte Kaliumkanalproteine des Kv6.2 Typs mit mindestens 60% Sequenzidentität, sowie Derivate oder Fragmente der Kaliumkanalproteine, die die gleiche elektrophysiologische, pharmakologische und biologische Wirksamkeit und/oder Immunogenität aufweisen.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die bislang unbekannte Kaliumkanaluntereinheit Kv6.2 im Vorhof des Herzens von Säugern prominent exprimiert wird (siehe Beispiel 7). In Northern Blots von mRNA extrahiert aus verschiedenen humanen Geweben wurde Kv6.2 mRNA zusätzlich noch in Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas und in sehr geringen Mengen in Gehirn, Lunge und Placenta gefunden.

Das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein sowie Homologe, Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität sind auf verschiedenen, dem Fachmann bekannten Wegen erhältlich. Zum einen können das Kaliumkanalprotein oder Homologe, Derivate oder Fragmente desselben mittels chemischer Synthese hergestellt werden. Des Weiteren können Antikörper gegen Fragmente des Polypeptids nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt werden (E. Harlow und D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.). Mittels dieser Antikörper kann dann das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein oder Derivate und Fragmente desselben aus Zellen isoliert werden, die es exprimieren. Dabei kann es sich um Zellen handeln, die natürlicherweise das Kaliumkanalprotein exprimieren.

mieren, es ist aber ebenso denkbar, daß Zellen verwendet werden, in die für das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein kodierende Nukleinsäuremoleküle eingeführt werden und die das Protein anschließend unter geeigneten Bedingungen exprimieren.

Gegenstand der Erfahrung ist ferner ein Kaliumkanal, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er mindestens die Kalium-

5 kanaluntereinheit Kv6.2 enthält. Erfindungsgemäß kann der Kaliumkanal neben der Untereinheit Kv6.2 auch andere Kaliumkanaluntereinheiten enthalten. Dabei kommen besonders die Untereinheiten Kv2.1, Kv2.2 und Kv2.3 in Frage. Besonders bevorzugt enthält er zusätzlich die Kaliumkanaluntereinheit Kv2.1. Die spezifischen Eigenschaften des Kaliumkanals hängen von den Kaliumkanaluntereinheiten ab, die er neben Kv6.2 enthält. Enthält er neben Kv6.2 die Kaliumkanaluntereinheit Kv2.1, so handelt es sich um einen spannungsabhängigen Kaliumkanal, der bei Depolarisierung der

10 Membran Auswärtsströme vermittelt.

Gegenstand der Erfahrung sind ferner Nukleinsäuremoleküle, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie für die erfindungsgemäßen Kaliumkanalproteine und Kaliumkanäle, deren Homologe, Derivate und/oder Fragmente mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und Immunogenität kodieren. Besonders bevorzugt können diese erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ausgewählt werden aus

15

- a) der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz,
- b) syngenen oder komplementären Sequenzen der Sequenzen gemäß a), soweit sie für Proteine und Polypeptide mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren, und
- c) allelischen Varianten und Fragmenten der Sequenzen gemäß a) und b).

20

Bestandteil der Erfahrung ist ferner ein Vektor, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er eines oder mehrere der oben genannten Nukleinsäuremoleküle enthält. Geeignete Vektoren sind pBluescript KS⁺ und pBluescript KS⁻ (Stratagene, La Jolla, CA, US), sind aber nicht auf diese beschränkt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfahrung ist der Vektor ein Expressionsvektor. Ein geeigneter Expressionsvektor ist pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US), die Erfahrung ist aber nicht auf diesen beschränkt. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können in diese Vektoren nach allgemeinen bekannten Methoden kloniert werden (T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, US). Erfindungsgemäß enthalten die Expressionsvektoren Kontrollelemente für Transkription, Transkriptionsstart, Transkriptionsende, mRNA-Prozessierung und Translation, die in den erfindungsgemäß verwendeten Expressionssystemen in aktiver Form vorliegen.

25

Bevorzugt enthalten die erfindungsgemäßen Vektoren Sequenzen, die die Replikation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle erleichtern. Besonders bevorzugt enthalten sie ferner Sequenzen, die die Integration der Nukleinsäuremoleküle in das Genom einer Wirtszelle erleichtern.

30

Gegenstand der Erfahrung sind ferner Wirtszellen, die mit den erfindungsgemäßen Vektoren transformiert sind. Besonders bevorzugt sind diese Wirtszellen CHO-Zellen oder Xenopus Oozyten. Als Wirtszellen kommen aber auch andere Eukaryontenzellen aus der Gruppe bestehend aus COS, HEK 293, NIH-3T3 in Frage, sind aber nicht auf diese beschränkt. Von Bedeutung ist, daß die Promotor- und/oder Enhancersequenzen auf die mit den Vektoren transformierten Wirtszellen abgestimmt sind. Dadurch kann eine erhöhte Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide sichergestellt werden.

35

Ferner ist eine Wirtszelle Gegenstand dieser Erfahrung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie neben den erfindungsgemäßen Vektoren zusätzlich mit einem weiteren Vektor transformiert ist, der eine Nukleinsäuresequenz enthält, die für eine andere Kaliumkanaluntereinheit kodiert. Besonders bevorzugt kodiert diese Nukleinsäuresequenz für die Kaliumkanaluntereinheit Kv2.1 (B. Albrecht et al. Receptor and Channel 1 (1993) 99-100). Sie kann aber auch für andere Kaliumkanaluntereinheiten wie Kv2.2 und Kv2.3 kodieren.

40

Gegenstand der vorliegenden Erfahrung ist ferner eine Wirtszelle, die einen funktionellen Kaliumkanal exprimiert, der die Kaliumkanaluntereinheit Kv6.2 enthält. Die erfindungsgemäße Wirtszelle exprimiert den funktionellen Kaliumkanal vorzugsweise auf ihrer Oberfläche, es ist aber ebenso möglich, daß der funktionelle Kaliumkanal in intrazellulären Membranen exprimiert ist.

45

Erfindungsgemäß eingeschlossen ist ferner ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, die von den erfindungsgemäßen Wirtszellen exprimierten Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren und/oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man

50

- a) an den erfindungsgemäßen Wirtszellen den Kaliumauswärtsstrom mißt,
- b) die Wirtszellen mit einer zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt und
- c) an den Wirtszellen erneut den Kaliumauswärtsstrom mißt,

55

wobei der Unterschied zwischen den Kaliumauswärtsströmen vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern umso höher, je niedriger die hinzuzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung der Kaliumauswärtsströme zu erreichen.

60

Besonders bevorzugt exprimieren die verwendeten Wirtszellen den erfindungsgemäßen Kaliumkanal auf ihrer Oberfläche. Auf diese Weise können die Substanzen dadurch identifiziert bzw. getestet werden, daß man den Ausstrom von Ionen aus den Zellen durch den erfindungsgemäßen Kaliumkanal mißt. Das Ausströmen von Ionen wird bevorzugt mit der "patch-clamp"-Methode (vgl. z. B. O.-P. Hamill et al., Pflügers Arch. (1981) 85-100) durch Anlegen depolarisierender Testpotentiale bestimmt.

65

Im Rahmen der vorliegenden Erfahrung ist ferner eingeschlossen, die erfindungsgemäßen Wirtszellen nach dem Fachmann gut bekannten Methoden mit ⁸⁶Rb-Ionen zu beladen, die durch Kaliumkanäle so gut wie Kaliumionen permeieren können. Die beladenen Zellen können in Gegenwart von zu testenden Substanzen kultiviert werden. Danach kann der

Einfluß der Substanzen auf den ^{86}Rb -Auswärtsstrom der mit ^{86}Rb beladenen Zellen mit dem Fachmann bekannten Methoden gemessen werden (R.S. Rogowski et al. Mol. Pharmacol 50 (1996) 1167–1177).

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine öffnende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz keine Kaliumauswärtsströme fließen, Kaliumauswärtsströme fließen. 5

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine aktivierende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom verstärkt wird.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine schließende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz Kaliumauswärtsströme fließen, keine Kaliumauswärtsströme fließen. 10

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine inaktivierende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom vermindert wird, ohne daß der Kaliumauswärtsstrom vollständig zum Erliegen kommt.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine verändernde Substanz bezeichnet, wenn durch Zugabe der Substanz biophysikalische Eigenschaften des Kaliumkanals wie Spannungsabhängigkeit, Leitfähigkeit, Aktivierungszeitkonstanten, Inaktivierungszeitkonstanten, Schaltverhalten, Offenzeiten oder Geschlossenzeiten verändert werden. 15

Änderungen in der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung führen erwartungsgemäß bei Testpotentialen, die Kaliumauswärtsströme hervorrufen, zu einer Stromzunahme oder Stromabnahme. Leitfähigkeitsänderungen führen ebenfalls zu einer Zu- oder Abnahme der Kaliumauswärtsströme. Änderungen der Aktivierungszeitkonstanten führen zu einer Verlangsamung oder Beschleunigung der Aktivierung von Kaliumauswärtsströmen. Änderungen der Inaktivierungszeitkonstanten sowie des Schaltverhaltens können während eines Testpulses zu einer Zunahme oder Abnahme der Auswärtsströme führen. Das gleiche gilt, wenn die Offenzeiten oder Geschlossenzeiten der zu messenden Kaliumkanäle verändert werden (B. Hille, Ionic Channels of Excitable Membranes, 2. Ausgabe (1993), Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA).

Erfindungsgemäß wird eine Substanz auch dann als eine verändernde Substanz bezeichnet, wenn durch Zugabe der Substanz die Zelloberflächenexpression des Kaliumkanals verändert wird. Eine Veränderung der Zelloberflächenexpression führt zu einer Zunahme bzw. Abnahme der zu messenden Kaliumauswärtsströme. 25

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man 30

- a) an den erfindungsgemäßen Wirtszellen das Membranpotential mißt,
- b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
- c) an den Wirtszellen erneut das Membranpotential mißt,

wobei der Unterschied zwischen dem Membranpotential vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern umso höher, je niedriger die einzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung des Membranpotentials zu erreichen. 35

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man

- a) in den erfindungsgemäßen Wirtszellen das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom mißt,
- b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
- c) das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom erneut mißt,

wobei die Unterschiede zwischen dem Membranpotential und dem Kaliumauswärtsstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern umso höher, je niedriger die einzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung des Membranpotentials sowie des Kaliumauswärtsstromes zu erreichen. 50

Besonders bevorzugt sind die in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Wirtszellen Xenopus Oozyten. Ferner sind erfindungsgemäß CHO Zellen sowie andere Gewebekulturzellen wie COS-Zellen und HEK 293 Zellen bevorzugt, die Auswahl ist aber nicht auf diese beschränkt, solange in den verwendeten Wirtszellen ein funktioneller Kaliumkanal erhalten werden kann. 55

Überraschenderweise hat es sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung gezeigt, daß funktionelle Kaliumkanäle, welche die Kaliumkanaluntereinheiten Kv6.2 und Kv2.1 enthalten, einen hochaffinen Rezeptor für Propafenon darstellen. Daher eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung von Wirtszellen, die den Kv2.1/Kv6.2-Kaliumkanal exprimieren, zum Auffinden und Testen von neuen oder bekannten Substanzen und Wirkstoffen, die einen Effekt auf den Herzrhythmus haben. Besonders bevorzugt eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zum Auffinden und Testen von Klasse IC Antiarrhythmika. 60

Somit ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Identifizierung von Substanzen möglich, die dazu geeignet sind, die erfindungsgemäß Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern. Aufgrund der spezifischen Lokalisation und Funktion dieser Kanäle können deren Modulatoren (aktivierend oder inaktivierend) in unterschiedlichen cardiovasculären und neuronalen Bereichen eine Behandlung ermöglichen. 65

Im cardiovasculären Bereich sind außer dem Herzrhythmus die Kontraktionskraft und die Herzdurchblutung von Be-

deutung. Modulatoren der erfundungsgemäßen Kaliumkanäle können somit potentiell in der Therapie von Arrhythmien oder Bluthochdruck sowie bei der Cardioprotektion eingesetzt werden.

Im neuronalen Bereich spielen Kaliumkanäle eine entscheidende Rolle in der Regulation der Aktivität von Neuronen. Modulatoren dieser Kaliumkanäle können potentiell Lern- und Gedächtnisfunktionen beeinflussen und beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. Epilepsien, Ischämien, Schlaganfall, Morbus Parkinson und Alzheimer) therapeutisch eingesetzt werden.

Ferner werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Antikörper zur Verfügung gestellt, die an das isolierte erfundungsgemäße Kaliumkanalprotein oder an Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität binden. Ferner werden Antikörper zur Verfügung gestellt, die an das erfundungsgemäße Kaliumkanalprotein oder an Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität binden, wobei das Kaliumkanalprotein oder die Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität Bestandteil eines Kaliumkanals sind und somit eine andere dreidimensional Struktur aufweisen können als die isolierten erfundungsgemäßen Kaliumkanalproteine. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern sind dem Fachmann allgemein bekannt (E. Harlow und D. Lane, a.a.O.). Die Antikörper sind erhältlich, indem man Tiere mit dem erfundungsgemäßen Kaliumkanalprotein oder Derivaten oder Fragmenten desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität immunisiert. Polykonale Antikörper werden dann aus dem Serum der Tiere gewonnen, während monoklonale Antikörper aus dem Überstand von Hybridomzellen erhältlich sind. Hybridomzellen sind erhältlich, indem man Antikörper produzierende Zellen mit Tumorzellen fusioniert (E. Harlow and D. Lane, a.a.O.).

Erfundungsgemäß eingeschlossen sind auch Spezieshomologe des erfundungsgemäßen humanen Kaliumkanalproteins Kv6.2 sowie deren Derivate und/oder Fragmente mit gleicher Immunogenität. Die Spezieshomologe zeichnen sich dadurch aus, daß sie aus vom Menschen verschiedenen Spezies entstammen und eine Aminosäureidentität von mindestens 60% zum erfundungsgemäßen humanen Kaliumkanalprotein aufweisen und – wie bereits oben beschrieben – zusammen mit anderen Kaliumkanaluntereinheiten Kaliumkanäle bilden, die vorzugsweise Klasse IC Antiarrhythmika binden.

Besonders bevorzugt stammt das Spezieshomologe aus der Maus und weist die in SEQ ID NO: 4 gezeigte Aminosäuresequenz auf.

Die Erfindung wird im folgenden durch Beispiele, Sequenzprotokolle und Figuren verdeutlicht.

30

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1

A) Genomische Organisation des humanen Kv6.2 Gens

Die kodierende Region ist schematisch durch zwei Rechtecke dargestellt. Die sieben schwarzen Balken zeigen die sechs hydrophoben, möglicherweise membranspannenden Segmente S1 bis S6 und das an der Porenbildung beteiligte Segment P an. Restriktionsschnittstellen sind wie folgt abgekürzt: EV-EcoRV, P-PstI, S-SacI, B-BamHI. Diese Restriktionsschnittstellen wurden durch einzelne bzw. doppelte Verdauungen und die Sequenzierung lokalisiert. Die Exon-Intron Übergänge (SEQ ID NO: 9 und 13) wurden durch Vergleich der genomischen Sequenz des humanen Kv6.2 mit der humanen Kv6.2 cDNA (hKv6.2 cDNA SEQ ID NO: 1) bzw. der Maus cDNA (mKv6.2 cDNA SEQ ID NO: 3) erhalten. Das humane genomische SacI/PstI-Fragment (Probe A) wurde als Hybridisierungssonde für die Northern-Analyse in Fig. 2 verwendet. Die gestrichelten Linien verweisen auf die genomischen Sequenzen der Exon-Intron Übergänge. Intronsequenzen sind unterstrichen. Unterhalb der hKv6.2 Sequenz ist die abgeleitete Teilproteinsequenz angegeben. mKv6.2 cDNA und hKv6.2 cDNA zeigen die cDNA-Sequenzen im Bereich der Exon-Intron Übergänge.

B) Konservierte Nucleotid-Sequenzen des humanen Kv6.2 (SEQ ID NO: 1) und des *Mus musculus* Kv6.2 Gens (SEQ ID NO: 3), aus denen der offene Leserahmen abgeleitet wurde.

Die Striche (-) in der Maus-Sequenz deuten auf zur humanen Sequenz identische Nukleotide hin.

C) Offener Leserahmen der abgeleiteten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) der humanen Kv6.2 α -Untereinheit.

Die sechs hydrophoben, möglicherweise membranspannenden Segmente sind mit S1 bis S6 markiert. Die Markierungen mit PKC und CamK zeigen die putativen Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C und Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Kinase II.

D) Homologie (in %) der humanen Kv6.2 Proteinsequenz (SEQ ID NO: 2) zu Proteinsequenzen von repräsentativen Mitgliedern der einzelnen Kv-Unterfamilien aus der Ratte.

55

Fig. 2

A) Northern-Analyse der Expression humaner Kv6.2 mRNA in verschiedenen Geweben.

Die aufgetragene mRNA ist über der jeweiligen Spur vermerkt. Das humane genomische SacI/PstI-Fragment (SEQ ID NO: 5), das in Fig. 1A als Probe A bezeichnet ist, wurde als Hybridisierungssonde verwendet. In Herz, Niere, Muskel, Leber und Pankreas wurde eine 5.5 kb große Kv6.2 mRNA detektiert. Die RNA-Menge in den einzelnen Bahnern wurde durch eine Hybridisierung mit einer markierten β -Aktin cDNA Probe kontrolliert.

B) Northern-Analyse der Expression der Kv6.2 mRNA in verschiedenen Geweben der Ratte.

Die Herkunft der aufgetragenen mRNA ist über der jeweiligen Spur vermerkt. Ein genomics DNA-Fragment (SEQ ID NO: 7), das die DNA-Sequenz von MKv6.2 zwischen Nucleotid 1281-1443 in Fig. 1B beinhaltet, wurde hier als Hybridisierungssonde benutzt. Eine präferentiell im Herz exprimierte 2.6 kb lange mRNA wurde detektiert. Die RNA Menge in den einzelnen Bahnern wurde durch eine Hybridisierung mit einer markierten β -Aktin cDNA Probe überprüft.

C) Northern-Analyse der Expression der Kv6.2 mRNA innerhalb verschiedenem Regionen des Ratten-Herzens. Die aufgetragenen mRNAs aus verschiedenen Regionen des Ratten-Herzens sind über der jeweiligen Spur vermerkt. Die Kv6.2-Expression in Vorhofkammern ist stärker als in Septum und ventrikulären Kammern.

Fig. 3

5

In situ Hybridisierung und immunocytochemische Lokalisation des mKv6.2-Gens in adultem Maus-Gehirn. Eine 393 bp Antisense-RNA, die Nucleotide 1281-1443 der kodierenden mKv6.2 DNA (Fig. 1B(b), Seq. ID. Nr. 7) repräsentiert, wurde hier für die in situ Hybrisierung an adulten Maus-Gehirn-Schnitten verwendet.

A) Präferentielle Expression der Kv6.2 mRNA in Körner-Zellen des Gyrus Dentatus und in Pyramiden-Zellen des hippocampalen CA3-Feldes.
 B) Kontrolle mit einer Sense-RNA Probe.
 C) Maus-Gehirn-Schnitt angefärbt mit dem Anti-Kv6.2 Antikörper, wobei eine starke Färbung im Moosfasersystem des Hippocampus gefunden wurde.
 D) Blockierung der in Fig. 3C gezeigten Färbung durch Zugabe von Peptide (Kv6.2 Antigen).

Fig. 4

10

Lokalisation des Kaliumkanal-Gens, hKv6.2, in der Region des humanen Chromosoms 18q22-23.

20

Fig. 5

25

Vergleich der kinetischen Eigenschaften homomultimerer Kv2.1-Kanäle mit denen von Kanälen, die durch die Coexpression von Kv2.1 und Kv6.2 α -Untereinheiten gebildet werden.

A) Auswärtsströme gemessen mit der "patch-clamp"-Methode an mit hKv2.1 DNA (B. Albrecht et al., Receptor and Channels 1 (1995) 99. I:MBL Access. Nr. L02840) oder mit hKv6.2-DNA (SEQ ID NO: 1) transient transfizierten CHO-Zellen bzw. mit hKv2.1-DNA und hKv6.2-DNA cotransfizierten (hKv2.1 + hKv6.2) CHO-Zellen.

30

B) Auftragung normalisierter Leitfähigkeiten (G/Gmax, Ordinate) für humane Kv2.1-Ströme (gefüllte Kreise) und für coexprimierte humane Kv2.1-Ströme mit humanem Kv6.2 (offene Kreise) gegen das Membranpotential (Abzisse).

35

Jeder Punkt stellt den Mittelwert \pm Standardfehler von in sechs Experimenten für humanes Kv2.1 und elf Experimenten für das Kv2.1-Kv6.2 Heteromultimer durchgeföhrten Messungen dar. Durchgezogene Linien stellen die Ausgleichskurven gemäß der Boltzmann-Gleichung dar mit $V_{0.5} = +10.8 \pm 2.5$ mV für Kv2.1 alleine und $V_{0.5} = -10 \pm 2.5$ mV für Ströme für Kv2.1 koexprimiert mit Kv6.2 α -Untereinheiten (T-test für zwei Gruppen, $p < 0.005$). Die Steigung zwischen beiden Kurven weist keinen Unterschied auf ($S = 15.3 \pm 1.5$ für Kv2.1 Homomultimere; $S = 14.5 \pm 9$ für Kv2.1/Kv6.2 Heteromultimere). Die Koexpression von hKv2.1 und hKv6.2 verschiebt den Spannungsverlauf der Aktivierung um 20 mV zu negativeren Testpotentialen gegenüber hKv2.1 allein.

40

C) Effekt der hKv6.2 α -Untereinheit auf die Inaktivierungskinetik des Kv2.1-vermittelten Auswärtsstroms. Die Wellenformen von Kaliumströmen in CHO-Zellen, die mit Kv2.1 alleine transfiziert worden waren, wurden mit jenen überlagert, die von CHO-Zellen, die mit Kv2.1- und Kv6.2-Untereinheiten kotransfiziert worden waren. Die Depolarisierungspulse wurden bis +40 mV angelegt. Das Haltepotential betrug -80 mV. Die Inaktivierungszeit-Konstante für Kv2.1-Ströme beträgt $\tau = 7.17 \pm 2.1$ msec. ($n = 4$), und für Kv2.1/Kv6.2 coexprimierte Ströme beträgt $\tau = 4.98 \pm 5$ msec. ($n = 4$). Alle Transfektionen wurden in Gegenwart des Indikators GFP (grün fluoreszierendes Protein, M. Chalfie et al., Science 263 (1994) 802-805, S. Wang und T. Hazelrigg, Nature 369 (1994) 400-403) durchgeföhr. Die Transfektionsabläufe und die Bedingungen für das Aufzeichnen von Strömen an ganzen Zellen waren dieselben wie die in Fig. 6 beschrieben.

45

Fig. 6

50

Die Koexpression von hKv2.1 und hKv6.2 verschiebt gegenüber hKv2.1 den Spannungsverlauf der Deaktivierung um 60 mV zu negativeren Testpotentialen.

55

Beispiele

Beispiel 1

Isolierung von Klonen aus humanen und Maus genomischen DNA-Bibliotheken

60

$1 \cdot 10^6$ Plaques einer SVJ129 Maus genomischen DNA-Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) wurden in 20 NZ-Platten (NZ: 16 g/l NZ-Pulver, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Bacto-Agar; Chemikalien von Gibco BRL, Eggenstein, DE) mit einem Durchmesser 150 mm ausplattiert. Die genomische Phagen-DNA wurde dann auf 20 Membranfilter (Duralon-UV Membran, Stratagene) transferiert. Es folgte eine Hybridisierung der Filter in 50% Formamid, 0.8 M NaCl, 20 mM Pipes (Piperazin-N,N'-bis [2-ethansulfonsäure], Sigma), 1% SDS, 100 μ g/ml denaturierte Heringssperm-DNA, in H₂O und mit ³²P-markierter Maus Kv3.1 cDNA (Nucleotid 223-1356, Access. No. Y07521, Yokoyama et al., 1989) als Probe. Diese Hybridisierung wurde bei 60°C für 18 Stunden durchgeföhr. Die Filter wurden anschließend mit 0.1 \times SET/0.1% SDS in H₂O (20 \times SET: 3 M NaCl, 400 mM Tris/HCl, pH 7.4, 200 mM EDTA; Chemikalien von Sigma, für 0.1 \times SET wird 20 \times Set

65

1 : 200 verdünnt) gewaschen. Nach erfolgter Autoradiographie bei -70°C wurden die auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N.Y.) sichtbaren Signale den entsprechenden Plaques auf den Platten zugeordnet.

5 Die genomischen DNA-Fragmente wurden aus den positiven Phagen-Klonen isoliert und dann mit SacI, XbaI, EcoRI, BamHI und PstI sowohl einzeln als auch doppelt verdaut. Die verdauten DNA-Fragmente wurden in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf Nylonmembran transferiert. Drei DNA-Fragmente wurden durch eine weitere Hybridisierung, durchgeführt wie oben, identifiziert. Dies waren ein 1.0 kb BamHI/SacI Fragment, ein 1.0 kb XbaI/SacI Fragment und ein 0.9 kb SacI/PstI Fragment. Die Sequenzierungen der drei DNA-Fragmente zeigte, daß sie zusammen den gesamten kodierenden Bereich für Kv6.2 enthielten.

10 Die drei isolierten genetischen Maus DNA Fragmente wurden dann für die Isolierung des humanen Kv6.2-Gens als Hybridisierungssonden verwendet, wobei $1 \cdot 10^6$ Phagen-Plaques aus einer humanen genetischen DNA-Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) ausplattiert wurden. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen waren wie oben beschrieben. Nach Southern-Analyse und Sequenzierung wurden drei humane genetische Fragmente erhalten: ein 1.5 kb SacI/EcoRV Fragment, ein 0.8 kb PstI/SacI Fragment und ein 0.8 kb SacI/BamHI Fragment (Fig. 1A), die zusammen den gesamten kodierenden Bereich für Kv6.2 (Fig. 1C) enthielten.

15

Beispiel 2

Kartierung der Restriktionsschnittstellen innerhalb des isolierten genetischen DNA-Bereichs

20 Zur Erzeugung einer Restriktionskarte wurden die Insertionen der isolierten genetischen Phagen-DNAs mit Restriktionsenzymen nach Standardmethoden einfach oder doppelt verdaut und die Fragmente wurden anschließend in den Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (T. Maniatis et al., a.a.O.). Längenvergleiche der verdauten DNA-Fragmente ermöglichen die Erstellung der Restriktionskarten der isolierten genetischen Regionen (siehe Fig. 1 A). Die DNA-Fragmente, die der kodierenden Bereich des Kv6.2-Gens beinhalteten, wurden mit dem Fachmann bekannten Methoden durch Southern-Analysen (T. Maniatis et al., a.a.O., E.M. Southern, J. Mol. Biol. 98(1975) 503-517) innerhalb der isolierten genetischen Regionen lokalisiert. Die Sequenzierungen dieser DNA-Fragmente ermöglichen die Identifizierung der Transkriptionsrichtung des Kv6.2-Gens.

30

Beispiel 3

DNA-Sequenzierung

35 Die DNA-Fragmente, die dem kodierenden Bereich des Kv6.2.Gens entsprachen, wurden in die EcoRI-Schnittstellen des Bluescript Vektors (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert. Die Kv6.2 DNA wurde dann nach der Methode von Sanger et al., (P.N.A.S. USA 74 (1977) 5463-5467) mit T7-DNA Polymerase (Sequenase, US Biochemicals, Cleveland, Ohio) sequenziert. Plasmid-spezifische Oligonukleotide M13, Reverse, T3 und T7 (Stratagene, La Jolla, CA, SEQ ID Nos: 23-26) wurden für die Sequenzierungen als Primer verwendet.

40

Beispiel 4

Northern-Analyse

Der Multiple Tissue Northern (MTN) blot (Clontech, Palo Alto, CA) enthält jeweils 2 mg poly-A⁺ mRNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas. Das 0.6 kb SacI/PstI-Fragment (Probe A in Fig. 1A) wurde ³²P-markiert (T. Maniatis et al., a.a.O.) und dann als Hybridisierungssonde verwendet. Die Sonde wurde in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5xSET, 10x Denhardt's (100x Denhardt's: 20 g/l Ficoll 400 (Sigma), 20 g/l BSA (Sigma), 20 g/l Polyvinylpyrrolidon (Merck), 1 : 10 verdünnt), 1% SDS (Biorad), 100 mg/ml Heringssperm DNA (Sigma) in H₂O) bei 42°C 24 Stunden an die mRNA hybridisiert. Der Blot wurde anschließend nacheinander in Waschlösung 1 (2xSSC (20xSSC: 173 g/l NaCl, 88,2 g/l NaCitrat, pH 7,0, alle Chemikalien von Sigma, für 2xSSC 1 : 10 verdünnt); 0,1% SDS; in H₂O) bei RT und in Waschlösung 2 (0,1xSSC (20xSSC 1 : 200 verdünnt; 0,1% SDS; in H₂O) bei 50°C gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte eine Autoradiographie auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N.Y.) bei -70°C.

Der zweite Multiple Tissue Northern (MTN) blot (Clontech, Palo Alto, CA) enthält jeweils 2 mg poly-A⁺ mRNA aus Ratten-Herz, -Gehirn, -Milz, -Lunge, -Leber, -Skelettmuskel, -Niere und -Testis. Der Northern blot mit RNA aus Ratten-Herz enthält jeweils 5 mg poly-A⁺ mRNA aus linkem Vorhof, rechten Vorhof, Septum, linker ventrikularer Kammer und rechter ventrikularer Kammer. Das 1.2 kb SacI/SacI genetische Maus DNA-Fragment wurde ³²P-markiert und dann als Hybridisierungssonde für die beiden Blots verwendet. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen sowie die Autoradiographiebedingungen entsprachen denen des ersten MTN-Blots.

60

Beispiel 5

PCR

Die Verknüpfung der zwei kodierenden Bereiche des humanen Kv6.2-Gens wurde durch eine Kombination von PCR-Technik und Verdauung mit der Typ IIS Restriktionsendonuklease Eam 1104I durchgeführt (K.A. Padgett et al., Gene 168 (1996) 31-35). Der erste 624 bp kodierende Bereich für N-Terminus und S1-Segment (Nukleotide 1-624 von Seq. ID. Nr. 1) wurde durch PCR mit zwei Oligonukleotiden Seam1 (SEQ ID NO: 17) und Seam6 (SEQ ID NO: 19) amplifiziert, wobei das 1.2 kb große genetische humane SacI/EcoRV DNA-Fragment als Matrize verwendet wurde. Eine Ko-

zak-Sequenz (5'-CCACC-3', SEQ ID NO: 27) wurde vor das Start-Codon in das Seam1 Oligonukleotid eingebaut. Der zweiter 777 bp kodierender Bereich für S2-S6 Segmente und C-Terminus (Nukleotide 625-1401 von Seq. ID. Nr. 1) wurde durch eine zweite PCR mit Oligonukleotiden Seam5 (SEQ ID NO: 20) und Seam4 (SEQ ID NO: 22) amplifiziert, wobei das 1.6 kb PstI/BamHI genomische humane DNA-Fragment (Fig. 1A) als Matrize verwendet wurde. Für die beiden Amplifikationen wurde insgesamt 14 Reaktionszyklen mit KlenTaq Polymerase (Clontech, Palo Alto, CA) durchgeführt, wobei die methylierten Deoxycytosintriphosphate (dCTPs, Stratagene) in das DNA-Fragment durch Zugabe von 5'-Methyl-dCTP in den letzten fünf Reaktion-Zyklen eingebaut wurden. Die anschließende Verdauung mit Eam 1104I (Stratagene, La Jolla, CA) erzeugte komplementäre überhängende Enden am 3'-Ende des ersten PCR-Fragments (CCC) und am 5'-Ende des zweiten PCR-Fragments (GGG). Das eingebaute methyierte dCTP verhinderte die Verdauung der internen Eam 1104I Schnittstellen in den PCR-Fragmenten. Durch Ligation mit T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, Buffalo, NY) wurden die beiden PCR-Fragmente miteinander verknüpft. Es resultierte ein DNA-Fragment mit dem gesamten kodierenden Bereich des humanen Kv6.2-Gens.

Beispiel 6

Humane chromosomale Lokalisation

Ein 14 kb langer humaner genomischer λ DNA-Klon, der den kodierenden Bereich für S2-S6 und C-Terminus der Kv6.2 α -Untereinheit enthielt, wurde mit Biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim) markiert und dann für eine FISH-Analyse als Sonde verwendet. Die FISH-Analyse erfolgte nach der von P. Lichter et al., PNAS USA 85 (1988) 9664-9668 und C. Fonatsch et al., Int. J. Cancer 26 (1980) 749-754 beschriebenen Methode. Die Signale wurden mit Fluoreszenz-Isothiocyanat gekoppeltem Avidin-DCS® (Vector Laboratories) detektiert und die Lokalisierung der Signale in Metaphase-Chromosomen wurde mit Hilfe eines konfocalen Laser Scanning Mikroskops (C. Zeiss, LSM 410, Germany) durchgeführt.

Beispiel 7

In situ Hybridisierung und Immunzytochemie

Das 393 bp lange DNA-Fragment (Nukleotide 1-393 von SEQ ID NO: 7) aus dem 0.9 kb Maus SacI/PstI-DNA-Fragment wurde in den Blueskript Vektor umkloniert. Zwei linealisierte DNA-Klone mit dieser Insertion in zwei verschiedenen Orientierungen wurden für die Synthesen von Anti-Sense-RNA und Sense-RNA mit Hilfe des mMessageMachine Kits (Ambion, Austin, TX) verwendet, wobei die RNAs mit Hilfe von T₃- bzw. T₇-RNA-Polymerase synthetisiert und dabei mit ³³P-UTP markiert wurden (Melton et al., Nucleic Acids Res. 12 (1984) 7035-7056).

In einem Kryostaten wurden 10-16 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Min. in eiskalter, PBS gepufferter, 4%ige Formalin-Lösung fixiert. Die Hybridisierungen mit den ³³P-markierten Antisense- und Sense-RNAs erfolgten in Hybrisierungslösung (50% Formamid (Fluka), 10% Dextranulfat (Sigma), 0.3 M NaCl (Sigma), 20 mM Tris/HCl (Sigma, pH = 7.4), 5 mM EDTA (Sigma), 20 mM DTT (Dithiotreitol, Sigma), 1× Denhardt's Reagenz (100× Denhardt's 1 : 100 verdünnt), 100 μ g/ml denaturierte Lachssperma-DNA, 200 μ g/ml Hefe-tRNA) unter einem Deckgläschchen über Nacht bei 42°C. Die Schnitte wurden dann in 1×SSC/4 mM DTT bei 55-65°C gewaschen. Die Objektträger wurden dann über 1×SSC/4 mM DTT, 0.1×SSC, 75% Ethanol entwässert und luftgetrocknet. Die Exposition erfolgte für 3-7 Tage bei Raumtemperatur mit MR-Film (Kodak, Rochester, NY). Die Schnitte wurden dann in auf 42°C vorgewärmte Photoemulsion (Kodak, Rochester, NY) getaucht, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und für 1 Woche bei 4°C exponiert. Die Entwicklung erfolgte mit D19-Entwickler und Unifix (Kodak, Rochester, NY).

Für die Erzeugung der Antigen-Peptide wurde das 393 bp DNA-Fragment (Nukleotide 1-393 von SEQ ID NO: 7) aus dem 0.9 kb genomischen SacI/PstI Maus-DNA-Fragment isoliert und dann in den kodierenden Leserahmen des Glutathion-S-Transferase (GST) Gens im pGEX-2T Vektor (D.B. Smith und K.S. Johnson, Gene 67 (1988) 31-40) umkloniert. Dieses DNA-Fragment enthielt den kodierenden Bereich für den C-Terminus der mKv6.2 α -Untereinheit (C-mKv6.2, SEQ ID NO: 8). Das Fusionsprotein von GST und C-mKv6.2 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropylthiogalactosid, Gibco-BRL) in dem mit dieser Plasmid-DNA transformierten E.coli-Bakterienstamm XL-1 Blue (Stratagene) induziert und dann durch Glutathion-Agarose (Sigma, St. Louis, MO) aufgereinigt. Zwei ca. 4-5 Monate alte weibliche Kaninchen wurden mit diesem Fusionsprotein nach der Standard-Methode (E. Harlow und D. Lane, a.a.O.) immunisiert. Für die Affinitätsreinigung des Anti-Kv6.2 Antikörpers wurde C-mKv6.2 mit einem His-Tag im Bakterienstamm BL21 induziert, der den pET-16b Vektor (Novagen, Madison, WI, F.W. Studier et al., Methods in Enzymology 185 (1990) 60-89) mit dem 393 bp DNA-Fragment (Nukleotide 1-393 von Seq. ID. Nr. 7) enthielt. Die Aufreinigung des C-mKv6.2-Proteins mit His-Tag wurde durch eine Nickel-Säule (Novagen, Madison, WI) durchgeführt. Ca. 100 μ g aufgereinigtes C-mKv6.2-Protein wurde auf eine 1 cm² große Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Keen, NII) gebunden und dann zwei Stunden lang mit 1×PBS Lösung mit 5% Milchpulver bei Raumtemperatur blockiert. Die erhaltene Membran wurde in der PBS-Lösung mit 1 : 5 verdünntem Kaninchen-Antiserum über Nacht bei 4°C inkubiert und dann einmal in der Waschlösung 1 (1×PBS (20×PBS: 3 M NaCl, 161 mM Na₂HPO₄, 39 mM KH₂PO₄, 1 : 20 verdünnt), 1% BSA (Sigma), 0.5% Triton X-100 (Sigma)) und zweimal in der Waschlösung 2 (1×PBS, 1% BSA) gewaschen. Die Elution erfolgte in einer Elutionslösung (0.2 M Glycin, 0.15 M NaCl, 0.1% BSA, pH=2.5).

Adulte Mäuse wurden betäubt und mit einer Lösung aus 4% Formaldehyd, 0.05% Glutaraldehyd und 0.2% Pikrinsäure in 0.1 M Phosphatpuffer (pH=7.4) perfundiert. Nach der Fixierung wurde mit 0.15 M Saccharose in 0.13 M Phosphatpuffer (pH=7.4) gespült, das Gehirn wurde herausoperiert und auf -50°C eingefroren. 25 μ m dicke Gefrierschnitte wurden dann bei -21°C angefertigt. Die Schnitte wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 1% NaBH₄ in PBS reduziert und dann mit PBS gewaschen. Zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 30 Minuten bei

RT mit 0.05% Phenylhydrazin und 10% normales Ziege-Serum (Gibco-BRL) mit 0.3% Triton x-100 behandelt. Die Schnitte wurden mit dem 1 : 50 verdünnten gereinigten Anti-C-mKv6.2 Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Für das Peptid-Blockierungsexperiment wurde dieser Antikörper in einer 10 µg/ml Antigen-Peptidlösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur präinkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur mit der Zweitantikörperlösung (biotinylierter Ziege-Kaninchen Antikörper, 1 : 2000 in PBS, Camon) inkubiert und anschließend mit dem Elite-ABC-Komplex (Vectastain Elite-ABC Kit, Vector) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin wurde in 0.015% H₂O₂ für 3 min durchgeführt (S.M. Hsu et al., J. Histochem. Cytochem. 29 (1981) 577-580).

10

Beispiel 8

Funktionelle Expression und elektrophysiologische Technik

Das DNA-Fragment (SEQ ID NO: 1), das den gesamten kodierenden Bereich für die hKv6.2 α-Untereinheit enthielt, wurde in den dem Fachmann gut bekannten pCDNA3 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA) zu Expressionsstudien kloniert. hKv2.1 cDNA auch in einen anderen pCDNA3 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA) inseriert. Insgesamt 1 µg Plasmid-DNA (entweder Kv2.1, Kv6.2 allein oder Kv2.1 mit Kv6.2 zusammen) und lag DNA für GFP wurde zur Transfektion von CHO-Zellen mit DMRIE-C-Reagens (eine 1 : 1 Mischung aus Kation-Lipid DMRIE und Cholesterol, Gibco-BRL, Life Technologies) eingesetzt. 500 ml Opti-MEM 1-Medium (Gibco-BRL, Life Technologies) mit 2 µg Plasmid-DNA und 500 µl Opti-MEM 1-Medium mit 6.4 µl DMRIE-C-Reagens wurden zusammengemischt, und anschließend bei RT für 45 Minuten inkubiert, wobei ein Liposom-DNA-Komplex gebildet wurde. 2 · 10⁵ CHO-Zellen in einer 35-mm Schale wurden zuerst mit Opti-MEM 1-Medium gewaschen, danach wurde die Lösung mit diesem Lipid-DNA-Komplex auf die Zellschicht ausplattiert. Nach einer Inkubation für 5-6 Stunden bei 37°C in einem Inkubator unter 5% CO₂ wurde die Lösung durch normales Medium ersetzt, und die Zellen wurden für weitere 12-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 · 10⁴ Zellen in eine neue Schale (35 mm) für die elektrophysiologischen Messungen umgesetzt.

Auswärtsströme wurden 24-48 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe der whole-cell Konfiguration der patch-clamp Technik (O.P. Hamill et al., Pflügers Arch. (1981) 85-100) gemessen. Die Mikropipetten wurden mit einem DMZ-Universal Puller (Zetiz Instruments, Augsburg, Germany) gezogen und hatten einen Widerstand zwischen 2-3 MΩ nach der Füllung mit der intrazellulären Lösung (105 mM Kaliumaspartat, 20 mM KCl, 10 mM BAPTA, 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM Glukose, 2 mM ATP-Na₂, pH=7.2, alle Chemikalien von Sigma). Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die CHO-Zellen zuerst in einer extrazellulären Lösung (140 mM NaCl, 5.3 KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM Glukose, pH=7.3) auf einem Haltepotential -80 mV gehalten und anschließend depolarisiert auf Testpotentiale von -70 bis 80 mV in Abständen von 10 mV von je 300 ms Dauer.

35

40

45

50

55

60

65

DE 198 41 413 C 1

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: 5
 (A) NAME: Forschungsgesellschaft Genion mbH
 (B) STRASSE: Abteistr. 57
 (C) ORT: Hamburg
 (D) BUNDESLAND: Hamburg
 (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland 10
 (F) POSTLEITZAHL: 20149

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neuer spannungsabhängiger Kaliumkanal
und seine Verwendung zur Entwicklung von Therapeutika 15

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 27

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG: 20
 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1: 25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN: 30
 (A) LÄNGE: 1401 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT: 35
 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(ix) MERKMAL: 40
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 1..1401
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Reifes humanes Kv6.2 Protein"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG GAG CCA TGG CCC TGC TCC CCG GGC GGC GGC GGC GGG ACC CGC GCC
 Met Glu Pro Trp Pro Cys Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ala
 1 5 10 15

CGG CAC GTC ATC ATC AAC GTG GGC GGC TGC CGC GTG CGC CTG GCA TGG
 Arg His Val Ile Ile Asn Val Gly Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp
 20 25 30

GCC GCG CTG GCG CGA TGC CCC CTC GCG CGC CTG GAG CGC CTG CGC GCC
 Ala Ala Leu Ala Arg Cys Pro Leu Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Ala
 35 40 45

TGC CGC GGC CAC GAC GAC CTG CTG CGC GTG TGT GAC GAC TAC GAC GTG
 Cys Arg Gly His Asp Asp Leu Leu Arg Val Cys Asp Asp Tyr Asp Val
 50 55 60

48 45

96 50

144

192

65

DE 198 41 413 C1

| | |
|--|------|
| AGC CGC GAC GAG TTC TTC GAC CGC AGC CCG TGC GCC TTC CGC GCC Ser Arg Asp Glu Phe Phe Asp Arg Ser Pro Cys Ala Phe Arg Ala 65 70 75 80 | 240 |
| 5 ATC GTG GCG CTT TTG CGC GCA GGG AAG CTG CGA CTG CTG CGG GGC CCG Ile Val Ala Leu Leu Arg Ala Gly Lys Leu Arg Leu Leu Arg Gly Pro 85 90 95 | 288 |
| 10 TGC GCG CTG GCC TTC CGC GAC GAG CTG GCC TAC TGG GGC ATC GAC GAG Cys Ala Leu Ala Phe Arg Asp Glu Leu Ala Tyr Trp Gly Ile Asp Glu 100 105 110 | 336 |
| 15 GCG CGC CTG GAG CGC TGC TGC CTG CGC CGC CTG CGC CGC GAG GAG Ala Arg Leu Glu Arg Cys Cys Leu Arg Arg Leu Arg Arg Arg Glu Glu 115 120 125 | 384 |
| 20 GAG GCG GCC GAG GCC CGC GCG GGG CCG ACG GAG CGC GGG GCG CAG GGG Glu Ala Ala Glu Ala Arg Ala Gly Pro Thr Glu Arg Gly Ala Gln Gly 130 135 140 | 432 |
| 25 CGG CGC CTG CGC GAC GTG GTG GAC AAC CCG CAC TCG GGG CTG GCG GGC Arg Arg Leu Arg Asp Val Val Asp Asn Pro His Ser Gly Leu Ala Gly 165 170 175 | 528 |
| 30 AAG CTC TTC GCC TGC GTG TCC GTG TCC TTC GTG GCC GTC ACG GCC GTG Lys Leu Phe Ala Cys Val Ser Val Ser Phe Val Ala Val Thr Ala Val 180 185 190 | 576 |
| 35 GGC CTC TGC CTG AGC ACC ATG CCG GAC ATC CGC GCC GAG GAG GAG CGG Gly Leu Cys Leu Ser Thr Met Pro Asp Ile Arg Ala Glu Glu Glu Arg 195 200 205 | 624 |
| 40 GGC GAG TGC TCC CCC AAG TGC CGC AGC CTG TTC GTG CTG GAG ACC GTG Gly Glu Cys Ser Pro Lys Cys Arg Ser Leu Phe Val Leu Glu Thr Val 210 215 220 | 672 |
| 45 GAG AGC AAG TGC GCC TTC CTG CGC GCG CCA CTC AAC ATC ATT GAC ATC Glu Ser Lys Cys Ala Phe Leu Arg Ala Pro Leu Asn Ile Ile Asp Ile 245 250 255 | 768 |
| 50 CTG GCG CTC CTG CCG TTC TAC GTG TCG CTG CTG CTG GGG CTG GCG GCA Leu Ala Leu Pro Phe Tyr Val Ser Leu Leu Leu Gly Leu Ala Ala 260 265 270 | 816 |
| 55 GGC CCG GGC GGG ACC AAG CTC CTG GAG CGC GCG GGG CTG GTG CTG CGG Gly Pro Gly Thr Lys Leu Leu Glu Arg Ala Gly Leu Val Leu Arg 275 280 285 | 864 |
| 60 TCG CTG GGG CTG CGT TCG CTG GGC CTG ACC ATG CGC CGC TGC GCG CGC Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Gly Leu Thr Met Arg Arg Cys Ala Arg 305 310 315 320 | 960 |
| 65 GAG TTC GGG CTG CTG CTG TTC CTC TGC GTG GCC ATG GCG CTC TTC Glu Phe Gly Leu Leu Leu Phe Leu Cys Val Ala Met Ala Leu Phe 325 330 335 | 1008 |

DE 198 41 413 C 1

| | |
|---|---------|
| CGC CCA CTG GTG CAC CTG GCC GAG CGC GAG CTG GGC GCG CGC CGC GAC Ala Pro Leu Val His Leu Ala Glu Arg Glu Leu Gly Ala Arg Arg Asp 340 345 350 | 1056 |
| TTC TCC AGC GTG CCC GCC AGC TAT TGG TGG GCC GTC ATC TCC ATG ACC Phe Ser Ser Val Pro Ala Ser Tyr Trp Trp Ala Val Ile Ser Met Thr 355 360 365 | 1104 5 |
| ACC GTG GGC TAC GGC GAC ATG GTC CCG CGC AGC CTG CCC GGG CAG GTG Thr Val Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Arg Ser Leu Pro Gly Gln Val 370 375 380 | 1152 10 |
| GTG GCG CTC AGC AGC ATC CTC AGC GGC ATC CTG CTC ATG GCC TTC CCG Val Ala Leu Ser Ser Ile Leu Ser Gly Ile Leu Leu Met Ala Phe Pro 385 390 395 400 | 1200 15 |
| GTC ACC TCC ATC TTC CAC ACC TTT TCG CGC TCC TAC TCC GAG CTC AAG Val Thr Ser Ile Phe His Thr Phe Ser Arg Ser Tyr Ser Glu Leu Lys 405 410 415 | 1248 20 |
| GAG CAG CAG CAG CGC GCG GCC AGC CCC GAG CCG GCC CTG CAG GAG GAC Glu Gln Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu Gln Glu Asp 420 425 430 | 1296 |
| AGC ACG CAC TCG GCC ACA GCC ACC GAG GAC AGC TCG CAG GGC CCC GAC Ser Thr His Ser Ala Thr Ala Thr Glu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Asp 435 440 445 | 1344 25 |
| AGC GCG GGC CTG GCC GAC GAC TCC GCG GAT GCG CTG TGG GTG CGG GCA Ser Ala Gly Leu Ala Asp Asp Ser Ala Asp Ala Leu Trp Val Arg Ala 450 455 460 | 1392 30 |
| GGG CGC TGA Gly Arg * 465 | 1401 35 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 467 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

| | |
|---|----|
| Met Glu Pro Trp Pro Cys Ser Pro Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ala 1 5 10 15 | 50 |
| Arg His Val Ile Ile Asn Val Gly Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp 20 25 30 | 55 |
| Ala Ala Leu Ala Arg Cys Pro Leu Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Ala 35 40 45 | 55 |
| Cys Arg Gly His Asp Asp Leu Leu Arg Val Cys Asp Asp Tyr Asp Val 50 55 60 | 60 |
| Ser Arg Asp Glu Phe Phe Asp Arg Ser Pro Cys Ala Phe Arg Ala 65 70 75 80 | 60 |
| Ile Val Ala Leu Leu Arg Ala Gly Lys Leu Arg Leu Leu Arg Gly Pro 85 90 95 | 65 |

DE 19841413 C1

Cys Ala Leu Ala Phe Arg Asp Glu Leu Ala Tyr Trp Gly Ile Asp Glu
 100 105 110

5 Ala Arg Leu Glu Arg Cys Cys Leu Arg Arg Leu Arg Arg Arg Glu Glu
 115 120 125

Glu Ala Ala Glu Ala Arg Ala Gly Pro Thr Glu Arg Gly Ala Gln Gly
 130 135 140

10 Ser Pro Ala Arg Ala Leu Gly Pro Arg Gly Arg Leu Gln Arg Gly Arg
 145 150 155 160

Arg Arg Leu Arg Asp Val Val Asp Asn Pro His Ser Gly Leu Ala Gly
 165 170 175

15 Lys Leu Phe Ala Cys Val Ser Val Ser Phe Val Ala Val Thr Ala Val
 180 185 190

20 Gly Leu Cys Leu Ser Thr Met Pro Asp Ile Arg Ala Glu Glu Glu Arg
 195 200 205

Gly Glu Cys Ser Pro Lys Cys Arg Ser Leu Phe Val Leu Glu Thr Val
 210 215 220

25 Cys Val Ala Trp Phe Ser Phe Glu Phe Leu Leu Arg Ser Leu Gln Ala
 225 230 235 240

Glu Ser Lys Cys Ala Phe Leu Arg Ala Pro Leu Asn Ile Ile Asp Ile
 245 250 255

30 Leu Ala Leu Leu Pro Phe Tyr Val Ser Leu Leu Leu Gly Leu Ala Ala
 260 265 270

Gly Pro Gly Gly Thr Lys Leu Leu Glu Arg Ala Gly Leu Val Leu Arg
 275 280 285

Leu Leu Arg Ala Leu Arg Val Leu Tyr Val Met Arg Leu Ala Arg His
 290 295 300

40 Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Gly Leu Thr Met Arg Arg Cys Ala Arg
 305 310 315 320

Glu Phe Gly Leu Leu Leu Phe Leu Cys Val Ala Met Ala Leu Phe
 325 330 335

45 Ala Pro Leu Val His Leu Ala Glu Arg Glu Leu Gly Ala Arg Arg Asp
 340 345 350

Phe Ser Ser Val Pro Ala Ser Tyr Trp Trp Ala Val Ile Ser Met Thr
 355 360 365

50 Thr Val Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Arg Ser Leu Pro Gly Gln Val
 370 375 380

Val Ala Leu Ser Ser Ile Leu Ser Gly Ile Leu Leu Met Ala Phe Pro
 385 390 395 400

60

65

DE 198 41 413 C 1

| | | |
|---|-----|-----|
| Val Thr Ser Ile Phe His Thr Phe Ser Arg Ser Tyr Ser Glu Leu Lys | 415 | |
| 405 | 410 | |
| Glu Gln Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu Gln Glu Asp | 5 | |
| 420 | 425 | 430 |
| Ser Thr His Ser Ala Thr Ala Thr Glu Asp Ser Ser Gln Gly Pro Asp | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ser Ala Gly Leu Ala Asp Asp Ser Ala Asp Ala Leu Trp Val Arg Ala | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Gly Arg * | | |
| 465 | | 15 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1446 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Maus
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 1..1446
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Reifes murines Kv6.2 Protein"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| ATG GCC CGG CTC CTG GGG CAC CCG GAG GCC CCC GAC GCG GAA CCT GGC | 48 | | |
| Met Ala Arg Leu Leu Gly His Pro Glu Ala Pro Asp Ala Glu Pro Gly | | | |
| 470 | 475 | 480 | |
| AGC GCA GGC CGA CAG GGC CGT GGC GGC CGC GGG GCC CGG GCG CGC CAC | 96 | | |
| Ser Ala Gly Arg Gln Gly Arg Gly Arg Gly Ala Arg Ala Arg His | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| GTC GTT ATC AAC ATC TGG GGC TGC AGG GTG CGT CTG GCC TGG GCC GCG | 144 | | |
| Val Val Ile Asn Ile Trp Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp Ala Ala | | | |
| 500 | 505 | 510 | 515 |
| CTG GCC CGC TGT CTC CTG GCG CGC CTC GAG CGC CTG CGA ACC TGC CGC | 192 | | |
| Leu Ala Arg Cys Leu Leu Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Thr Cys Arg | | | |
| 520 | 525 | 530 | |
| GGC CAC GAG AAA CTG CTG CGC GTG TGT TAC GAC TAC GAC ATG AGC CGC | 240 | | |
| Gly His Glu Lys Leu Leu Arg Val Cys Tyr Asp Tyr Asp Met Ser Arg | | | |
| 535 | 540 | 545 | |
| GAC AAA TTC TTC GAA GGC AGC CCG TGC GCT TTC GGC CCC ATC GTG | 288 | | |
| Asp Lys Phe Phe Glu Gly Ser Pro Cys Ala Phe Gly Pro Ile Val | | | |
| 550 | 555 | 560 | |

DE 19841413 C1

| | | |
|----|---|------|
| 5 | GCG CTG CTG CGC GCC CGC AAA GTG AGG GTG CTG CGC GGC CCT TGC GCC Ala Leu Leu Arg Ala Arg Lys Val Arg Val Leu Arg Gly Pro Cys Ala 565 570 575 | 336 |
| 10 | CTG GCC TTC CGC GAA AAA GTG GCC TAC TGG GGC ATC GAC GAA ACG CGG Leu Ala Phe Arg Glu Lys Val Ala Tyr Trp Gly Ile Asp Glu Thr Arg 580 585 590 595 | 384 |
| 15 | CTG GAA CGC TGC TGC CTG CGC CGC CTG CGC CGC GAG GAG GAG GGC Leu Glu Arg Cys Cys Leu Arg Arg Leu Arg Arg Glu Glu Ala 600 605 610 | 432 |
| 20 | CCC GAG GCC AGC GCC GCG CAG CCC GCC CGA GGG CCG CAG ACC ACC CCC Pro Glu Ala Ser Ala Ala Gln Pro Ala Arg Gly Pro Gln Thr Thr Pro 615 620 625 | 480 |
| 25 | CGC CGA GCC CTG GGA CCC AGC GGG CGG CTG GAG AGA GGC AGA CGG CGC Arg Arg Ala Leu Gly Pro Ser Gly Arg Leu Glu Arg Gly Arg Arg Arg 630 635 640 | 528 |
| 30 | TTG CGA GAC GTG GTG GAG AAC CCG CAC TCC GGG CTG GCG GGC ATC TTT Leu Arg Asp Val Val Glu Asn Pro His Ser Gly Leu Ala Gly Ile Phe 645 650 655 | 576 |
| 35 | TTC GCA TAT GTC TCC GTG GCT TTC GTG GCC GTC ACA GCC GTC GGC TTG Phe Ala Tyr Val Ser Val Ala Phe Val Ala Val Thr Ala Val Gly Leu 660 665 670 675 | 624 |
| 40 | TGC CTG AGC ACC ATG CCG GAT GTC CGC GCA GAA GAG GAA CGG GGC GAG Cys Leu Ser Thr Met Pro Asp Val Arg Ala Glu Glu Glu Arg Gly Glu 680 685 690 | 672 |
| 45 | TGC TCC ACA AAG TGC CGC AAC CTG TTC GTG CTG GAG ACG GTG TGC GTG Cys Ser Thr Lys Cys Arg Asn Leu Phe Val Leu Glu Thr Val Cys Val 695 700 705 | 720 |
| 50 | GCC TGG TTC TCC TTC GAG TTC CTG CTG CGC TCC CTG CAG GCT GAG AGC Ala Trp Phe Ser Phe Glu Phe Leu Leu Arg Ser Leu Gln Ala Glu Ser 710 715 720 | 768 |
| 55 | AAG TGC GCC TTC CTC CGG ACG CCG CTT GCC ATC ATC GAC ATC CTG GCC Lys Cys Ala Phe Leu Arg Thr Pro Leu Ala Ile Ile Asp Ile Leu Ala 725 730 735 | 816 |
| 60 | ATC CTG CCC TTA TAC GTG TCG CTG CTC GCG GGA CTG GCG GCA GGG CCC Ile Leu Pro Leu Tyr Val Ser Leu Leu Ala Gly Leu Ala Ala Gly Pro 740 745 750 755 | 864 |
| 65 | ACG GGC AGC AAG ATG CTG GAG CGC GCG GGT CTG GTG CTG CGG CTG CTG Thr Gly Ser Lys Met Leu Glu Arg Ala Gly Leu Val Leu Arg Leu Leu 760 765 770 | 912 |
| 70 | CGG GCG CTG CGC GTG CTC TAC GTG ATG CGC CTG GCG CGC CAC TCG TTG Arg Ala Leu Arg Val Leu Tyr Val Met Arg Leu Ala Arg His Ser Leu 775 780 785 | 960 |
| 75 | GGG CTG CGC TCG CTT GGC CTC ACC GTG CGC CGC TGC GCG CGC GAG TTC Gly Leu Arg Ser Leu Gly Leu Thr Val Arg Arg Cys Ala Arg Glu Phe 790 795 800 | 1008 |
| 80 | GGA CTG CTG CTG CTC TTC CTC TGC GTG GCC ATG GCG CTC TTC GCG CCG Gly Leu Leu Leu Phe Leu Cys Val Ala Met Ala Leu Phe Ala Pro 805 810 815 | 1056 |
| 85 | CTC GTG CAC CTG GCT GAG CGC GAG CTG GGC GCT CAC CGC GAC TTC TCC Leu Val His Leu Ala Glu Arg Glu Leu Gly Ala His Arg Asp Phe Ser 820 825 830 835 | 1104 |

DE 198 41 413 C 1

| | | |
|---|------|----|
| AGC GTC CCC GCC AGC TAC TGG TGG GCA GTC ATC TCC ATG ACC ACC GTG Ser Val Pro Ala Ser Tyr Trp Trp Ala Val Ile Ser Met Thr Thr Val 840 845 850 | 1152 | |
| GGC TAT GGA GAC ATG GTG CCG CGC AGC CTT CCG GGC CAG GTG GTG GCG Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Arg Ser Leu Pro Gly Gln Val Val Ala 855 860 865 | 1200 | 5 |
| CTG AGC AGC ATC CTC AGC GGC ATC CTG CTC ATG GCC TTC CCT GTC ACC Leu Ser Ser Ile Leu Ser Gly Ile Leu Leu Met Ala Phe Pro Val Thr 870 875 880 | 1248 | 10 |
| TCC ATC TTC CAC ACC TTC TCG CGC TCC TAT TCG GAG CTC AAG GAG CAG Ser Ile Phe His Thr Phe Ser Arg Ser Tyr Ser Glu Leu Lys Glu Gln 885 890 895 | 1296 | |
| CAA CAG CGC GCG GCC AGC CCT GAA CCG GCC CTG CGC GAG GAC AGC ACG Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu Arg Glu Asp Ser Thr 900 905 910 915 | 1344 | |
| CGT GAT GAC AGT ACA CGT TCG GCC AGC GCC ACT GAG GAC AGC TCT CAG Arg Asp Asp Ser Thr Arg Ser Ala Ser Ala Thr Glu Asp Ser Ser Gln 920 925 930 | 1392 | 20 |
| GAC CCT GAG ACC GCA GGC GCG GCA GGG AAC TTG CCG GGC CGG GTG GGA Asp Pro Glu Thr Ala Gly Ala Ala Gly Asn Leu Pro Gly Arg Val Gly 935 940 945 | 1440 | 25 |
| CCC TGA Pro * | 1446 | |
| | | 30 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 482 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Arg Leu Leu Gly His Pro Glu Ala Pro Asp Ala Glu Pro Gly
 1 5 10 15

Ser Ala Gly Arg Gln Gly Arg Gly Arg Gly Ala Arg Ala Arg His
 20 25 30

Val Val Ile Asn Ile Trp Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp Ala Ala
 35 40 45

Leu Ala Arg Cys Leu Leu Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Thr Cys Arg
 50 55 60

Gly His Glu Lys Leu Leu Arg Val Cys Tyr Asp Tyr Asp Met Ser Arg
 65 70 75 80

35

40

45

55

60

65

DE 19841413 C1

Asp Lys Phe Phe Glu Gly Ser Pro Cys Ala Phe Gly Pro Ile Val
 85 90 95
 5 Ala Leu Leu Arg Ala Arg Lys Val Arg Val Leu Arg Gly Pro Cys Ala
 100 105 110
 Leu Ala Phe Arg Glu Lys Val Ala Tyr Trp Gly Ile Asp Glu Thr Arg
 115 120 125
 10 Leu Glu Arg Cys Cys Leu Arg Arg Leu Arg Arg Glu Glu Ala
 130 135 140
 Pro Glu Ala Ser Ala Ala Gln Pro Ala Arg Gly Pro Gln Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 15 Arg Arg Ala Leu Gly Pro Ser Gly Arg Leu Glu Arg Gly Arg Arg
 165 170 175
 Leu Arg Asp Val Val Glu Asn Pro His Ser Gly Leu Ala Gly Ile Phe
 20 180 185 190
 Phe Ala Tyr Val Ser Val Ala Phe Val Ala Val Thr Ala Val Gly Leu
 195 200 205
 25 Cys Leu Ser Thr Met Pro Asp Val Arg Ala Glu Glu Arg Gly Glu
 210 215 220
 Cys Ser Thr Lys Cys Arg Asn Leu Phe Val Leu Glu Thr Val Cys Val
 225 230 235 240
 30 Ala Trp Phe Ser Phe Glu Phe Leu Leu Arg Ser Leu Gln Ala Glu Ser
 245 250 255
 Lys Cys Ala Phe Leu Arg Thr Pro Leu Ala Ile Ile Asp Ile Leu Ala
 35 260 265 270
 Ile Leu Pro Leu Tyr Val Ser Leu Leu Ala Gly Leu Ala Ala Gly Pro
 275 280 285
 40 Thr Gly Ser Lys Met Leu Glu Arg Ala Gly Leu Val Leu Arg Leu Leu
 290 295 300
 Arg Ala Leu Arg Val Leu Tyr Val Met Arg Leu Ala Arg His Ser Leu
 305 310 315 320
 45 Gly Leu Arg Ser Leu Gly Leu Thr Val Arg Arg Cys Ala Arg Glu Phe
 325 330 335
 Gly Leu Leu Leu Phe Leu Cys Val Ala Met Ala Leu Phe Ala Pro
 340 345 350
 50 Leu Val His Leu Ala Glu Arg Glu Leu Gly Ala His Arg Asp Phe Ser
 355 360 365
 Ser Val Pro Ala Ser Tyr Trp Trp Ala Val Ile Ser Met Thr Thr Val
 370 375 380
 Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Arg Ser Leu Pro Gly Gln Val Val Ala
 385 390 395 400
 60 Leu Ser Ser Ile Leu Ser Gly Ile Leu Leu Met Ala Phe Pro Val Thr
 405 410 415

DE 198 41 413 C 1

Ser Ile Phe His Thr Phe Ser Arg Ser Tyr Ser Glu Leu Lys Glu Gln
 420 425 430
 Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu Arg Glu Asp Ser Thr
 435 440 445 5
 Arg Asp Asp Ser Thr Arg Ser Ala Ser Ala Thr Glu Asp Ser Ser Gln
 450 455 460 10
 Asp Pro Glu Thr Ala Gly Ala Ala Gly Asn Leu Pro Gly Arg Val Gly
 465 470 475 480
 Pro * 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN: 20
 (A) LÄNGE: 620 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear 25
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT: 30
 (A) ORGANISMUS: Homo Sapiens
 (ix) MERKMAL: 35
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 150..620
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "kodierender Bereich des
 humanen genomischen SacI/PstI-Fragmentes"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5: 40
 GAGCTCACCT CCGAGGGTTC GGTGCCGGCC CGGCCCTGG ATCCCCGCGG GCGGACGCGC 60
 TCCCCCAGCT CAGCCCTCGC GACCCTAACG CGGTCCGTTC CTTTGCAGG AGCCGGGCAG 120 45
 GAGCCCTCG GTCCGGTCCG GCCCTGCCG ATG GAG CCA TGG CCC TGC TCC CCG 173
 Met Glu Pro Trp Pro Cys Ser Pro 1 5
 GGC GGC GGC GGG ACC CGC GCC CGG CAC GTC ATC ATC AAC GTG GGC 221
 Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ala Arg His Val Ile Ile Asn Val Gly 10 15 20
 GGC TGC CGC GTG CGC CTG GCA TGG GCC GCG CTG GCG CGA TGC CCC CTC 269 50
 Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp Ala Ala Leu Ala Arg Cys Pro Leu 25 30 35 40
 GCG CGC CTG GAG CGC CTG CGC GCC TGC CGC GGC CAC GAC GAC CTG CTG 317 55
 Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Ala Cys Arg Gly His Asp Asp Leu Leu 45 50 55
 CGC GTG TGT GAC GAC TAC GAC GTG AGC CGC GAC GAG TTC TTC TTC GAC 365
 Arg Val Cys Asp Asp Tyr Asp Val Ser Arg Asp Glu Phe Phe Phe Asp 60 65 70 60

DE 198 41 413 C 1

| | |
|--|-----|
| CGC AGC CCG TGC GCC TTC CGC GCC ATC GTG GCG CTT TTG CGC GCA GGG Arg Ser Pro Cys Ala Phe Arg Ala Ile Val Ala Leu Leu Arg Ala Gly 75 80 85 | 413 |
| 5 AAG CTG CGA CTG CTG CGG GGC CCG TGC GCG CTG GCC TTC CGA GAC GAG Lys Leu Arg Leu Leu Arg Gly Pro Cys Ala Leu Ala Phe Arg Asp Glu 90 95 100 | 461 |
| 10 CTG GCC TAC TGG GGC ATC GAC GAG GCG CGC ATG GAC TGC CGC TGC CTG Leu Ala Tyr Trp Gly Ile Asp Glu Ala Arg Met Asp Cys Arg Cys Leu 105 110 115 120 | 509 |
| 15 CGC CGC ATG CGC CGC CGC GAG GAG GAG GCG GCC GAG GCC CGC GCG GGG Arg Arg Met Arg Arg Glu Glu Glu Ala Ala Glu Ala Arg Ala Gly 125 130 135 | 557 |
| 20 CCG ACG GAG CGC GGG GCG CAG GGG AGC CCG GCG CGC GCC CTG GGA CCT Pro Thr Glu Arg Gly Ala Gln Gly Ser Pro Ala Arg Ala Leu Gly Pro 140 145 150 | 605 |
| 25 CGG GGG CGG CTG CAG Arg Gly Arg Leu Gln 155 | 620 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

| |
|--|
| 30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LÄNGE: 157 Aminosäuren (B) ART: Aminosäure (D) TOPOLOGIE: linear |
| 35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein |
| (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6: |
| 40 Met Glu Pro Trp Pro Cys Ser Pro Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ala 1 5 10 15 |
| 45 Arg His Val Ile Ile Asn Val Gly Gly Cys Arg Val Arg Leu Ala Trp 20 25 30 |
| 50 Ala Ala Leu Ala Arg Cys Pro Leu Ala Arg Leu Glu Arg Leu Arg Ala 35 40 45 |
| 55 Cys Arg Gly His Asp Asp Leu Leu Arg Val Cys Asp Asp Tyr Asp Val 50 55 60 |
| 60 Ser Arg Asp Glu Phe Phe Asp Arg Ser Pro Cys Ala Phe Arg Ala 65 70 75 80 |
| 65 Ile Val Ala Leu Leu Arg Ala Gly Lys Leu Arg Leu Leu Arg Gly Pro 85 90 95 |
| 75 Cys Ala Leu Ala Phe Arg Asp Glu Leu Ala Tyr Trp Gly Ile Asp Glu 100 105 110 |
| 80 Ala Arg Met Asp Cys Arg Cys Leu Arg Arg Met Arg Arg Arg Glu Glu 115 120 125 |
| 85 Glu Ala Ala Glu Ala Arg Ala Gly Pro Thr Glu Arg Gly Ala Gln Gly 130 135 140 |
| 90 Ser Pro Ala Arg Ala Leu Gly Pro Arg Gly Arg Leu Gln 145 150 155 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 392 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

10

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Maus

(ix) MERKMAL:

15

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 1..162
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= "Maus Kv6.2 (3'-Bereich)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

20

GAG CTC AAG GAG CAG CAA CAG CGC GCG GCC AGC CCT GAA CCG GCC CTG
 Glu Leu Lys Glu Gln Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu
 1 5 10 15

48

CGC GAG GAC AGC ACG CGT GAT GAC AGT ACA CGT TCG GCC AGC GCC ACT
 Arg Glu Asp Ser Thr Arg Asp Asp Ser Thr Arg Ser Ala Ser Ala Thr
 20 25 30

96

25

GAG GAC AGC TCT CAG GAC CCT GAG ACC GCA GGC GCG GCA GGG AAC TTG
 Glu Asp Ser Ser Gln Asp Pro Glu Thr Ala Gly Ala Ala Gly Asn Leu
 35 40 45

144

30

CCG GGC CGG GTG GGA CCC TGAGCTGTAC TGAGAACTTC AAGAGAGTCA
 Pro Gly Arg Val Gly Pro
 50

192

35

AGAGCCTCGG AGGACACCTA GCGCCAAGT ACCCAGGAGT TGGCAAACCTT GGTCTGGCAT
 ATCCTTGCAG CTGGCTGCC TCCCCAAGCA ATTCCCGAGC TTTCGATAGC CTGGAGGATA
 TAGCAACCTG GCTTTCTTT TGCTTTATT TTCCCTTCAG TTTAAATTT TCTATGGCTA
 ATTAAAAATA ATTGAGTCCC

252

312

40

372

392

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

50

(A) LÄNGE: 54 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

55

60

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Glu Leu Lys Glu Gln Gln Gln Arg Ala Ala Ser Pro Glu Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Arg Glu Asp Ser Thr Arg Asp Asp Ser Thr Arg Ser Ala Ser Ala Thr
 20 25 30

Glu Asp Ser Ser Gln Asp Pro Glu Thr Ala Gly Ala Ala Gly Asn Leu
 35 40 45

Pro Gly Arg Val Gly Pro
 50

15

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA

30 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Homo Sapiens

35 (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA
(B) LAGE: 1..22
(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Intron/Exon-Übergang"

40 (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 1..15
(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "kodierender Bereich/Exon"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

45 GCC GAG GAG GAG CGG GTGAGCG
 Ala Glu Glu Glu Arg
 1 5

22

50 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

55 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12

Ala Glu Glu Glu Arg

65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA

10

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Homo Sapiens

(ix) MERKMAL:

15

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_RNA
 (B) LAGE: 1..36
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Intron/Exon-Übergang"

(ix) MERKMAL:

20

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 24..36
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "kodierender Bereich/Exon"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

25

CCCCGTGTCC CCTCTCCCCC GCAG GGC GAG TGC TCC
 Gly Glu Cys Ser
 1

36

30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Gly Glu Cys Ser
 1

45

50

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA

60

65

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Maus

5 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 1..27
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "kodierender Bereich: Übergang Exon 1
 zu Exon 2"

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GCA GAA GAG GAA CGG GGC GAG TGC TCC
 Ala Glu Glu Glu Arg Gly Glu Cys Ser
 1 5

27

15

20 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 25 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

30 Ala Glu Glu Glu Arg Gly Glu Cys Ser
 1 5

35

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 40 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: RNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Homo Sapiens

(ix) MERKMAL:
 50 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 1..27
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "kodierender Bereich: Übergang Exon 1
 zu Exon 2"

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GCC GAG GAG GAG CGG GGC GAG TGC TCC
 Ala Glu Glu Glu Arg Gly Glu Cys Ser
 1 5

27

60

65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Ala Glu Glu Glu Arg Gly Glu Cys Ser
 1 5

5

10

15

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 1..32
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 1
 /note= "Primer für PCR"

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 17..32
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 1
 /note= "Kodierender Bereich im Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

AGTTACTCTT CACCAC CAT GGA GCC ATG GCC C
 Met Glu Pro Trp Pro
 1 5

32

45

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Met Glu Pro Trp Pro
 1 5

55

60

65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

15 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 1..32
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 6
 /note= "Primer für PCR"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

20 AGTTACTCTT CACCCCGCTC CTCCTCGGGCG CG

32

25 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 20:

30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

40 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 1..30
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 5
 /note= "Primer für PCR"

45 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 13..30
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 5
 /note= "Kodierender Bereich im Primer"

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

AGTTACTCT TCA GGG CGA GTG CTC CCC CAA
 Gly Glu Cys Ser Pro Lys

30

1

5

55 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 21:

60 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

65

DE 198 41 413 C 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Gly Glu Cys Ser Pro Lys
1 5

5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 22:

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 1..27
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= SEAM 4
/note= "Primer für PCR"

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

25

AGTTACTCTT CATGTGGGCG GCGCAGG

27

30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 23:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 1..17
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M13
/note= "Primer zum Sequenzieren"

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

50

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

55

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

60

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

65

5 (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 1..19
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Reverse
/note= "Primer zum Sequenzieren"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

10 GGAAACAGCT ATGACCATG 19

15 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 25:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

25 (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 1..20
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= T3
/note= "Primer zum Sequenzieren"

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

35 AATTAACCCCT CACTAAAGGG 20

40 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 26:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

50 (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 1..19
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= T7
/note= "Primer zum Sequenzieren"

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

60 GGAAACAGCT ATGACCATG 19

65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 1..5
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Kozak
/note= "Zum Einbau in Seaml"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

CCACC

5

20

Patentansprüche

1. Kaliumkanalprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist. 25
2. Kaliumkanalprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es die in SEQ ID NO: 4 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist.
3. Kaliumkanalprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Homologes, ein Derivat oder ein Fragment des Kaliumkanalproteins nach Anspruch 1 oder 2 ist, das die gleiche elektrophysiologische, pharmakologische und/oder biologische Wirkung und/oder Immunogenität aufweist. 30
4. Kaliumkanalprotein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäureidentität von mindestens 60% zum humanen Kaliumkanalprotein (SEQ ID NO: 2) aufweist und einer vom Menschen verschiedenen Spezies entstammt.
5. Kaliumkanal, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens das Kaliumkanalprotein einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
6. Kaliumkanal nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich das Kaliumkanalprotein Kv2.1 enthält.
7. Kaliumkanal nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß er ein spannungsabhängiger Kaliumkanal ist.
8. Nukleinsäuremolekül, dadurch gekennzeichnet, daß es für ein Kaliumkanalprotein nach den Ansprüchen 1 bis 4 kodiert.
9. Nukleinsäuremolekül, dadurch gekennzeichnet, daß es für einen Kaliumkanal nach den Ansprüchen 5 bis 7 kodiert.
10. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz enthält, die aus der Gruppe bestehend aus
 - a) der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz,
 - b) der in SEQ ID NO: 3 angegebenen Nukleotidsequenz,
 - c) syngenen oder komplementären Sequenzen der Sequenzen gemäß a) oder b), soweit sie für ein Protein mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren, und
 - d) allelischen Varianten und Fragmenten der Sequenzen gemäß a), b) oder c), soweit sie für ein Protein mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren.
11. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach Anspruch 8 enthält.
12. Vektor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Expressionsvektor ist.
13. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach Ansprüchen 9 oder 10 enthält.
14. Vektor nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Expressionsvektor ist.
15. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Vektor nach den Ansprüchen 11 oder 12 transformiert ist.
16. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Vektor nach den Ansprüchen 13 oder 14 transformiert ist.
17. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Vektor nach den Ansprüchen 11 oder 12 und einem weiteren Vektor, der eine Nukleinsäuremolekül enthält, das für ein weiteres Kaliumkanalprotein kodiert, transformiert ist.
18. Wirtszelle nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der weitere Vektor ein Nukleinsäuremolekül enthält, das für das Kaliumkanalprotein Kv2.1 kodiert.

DE 198 41 413 C 1

19. Wirtszelle nach den Ansprüchen 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine CHO-Zelle ist.

20. Wirtszelle nach den Ansprüchen 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Xenopus Oozyt ist.

21. Wirtszelle nach den Ansprüchen 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie den durch die Vektoren kodierten Kaliumkanal exprimiert.

5 22. Wirtszelle nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie den durch die Vektoren kodierten Kaliumkanal auf ihrer Oberfläche exprimiert.

23. Verfahren zur Expression eines Kaliumkanals, dadurch gekennzeichnet, daß man eine eukaryontische Wirtszelle nach den Ansprüchen 16 bis 22 unter Bedingungen kultiviert, die zur Expression des Kaliumkanals geeignet sind.

10 24. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) an Wirtszellen nach den Ansprüchen 16 bis 22 den Kaliumauswärtsstrom mißt,
- b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und

15 c) an Wirtszellen erneut den Kaliumauswärtsstrom mißt,
wobei der Unterschied zwischen dem Kaliumauswärtsstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.

25 25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man den Kaliumauswärtsstrom mit Hilfe der "patch-clamp"-Methode bestimmt.

26. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine öffnende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz keine Kaliumauswärtsströme fließen, Kaliumauswärtsströme fließen.

27. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine aktivierende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom verstärkt wird.

30 28. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine schließende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz Kaliumauswärtsströme fließen, keine Kaliumauswärtsströme fließen.

29. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine inaktivierende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom vermindert wird, ohne daß der Kaliumauswärtsstrom vollständig zum Erliegen kommt.

35 30. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine verändernde Substanz ist, wenn durch Zugabe der Substanz biophysikalische Eigenschaften des Kaliumkanals wie Spannungsabhängigkeit, Leitfähigkeit, Aktivierungszeitkonstanten, Inaktivierungszeitkonstanten, Schaltverhalten, Offenzeiten oder Geschlossenzeiten verändert werden.

31. Verfahren nach den Ansprüchen 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine verändernde Substanz ist, wenn durch Zugabe der Substanz die Zelloberflächenexpression des Kaliumkanals verändert wird.

32. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, dadurch gekennzeichnet, daß man

40 a) an Wirtszellen nach den Ansprüchen 16 bis 22 das Membranpotential mißt,
b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
c) an Wirtszellen erneut das Membranpotential mißt,
wobei der Unterschied zwischen dem Membranpotential vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.

45 33. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man

- a) an den erfundungsgemäßen Wirtszellen nach den Ansprüchen 16 bis 22, das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom mißt,
- b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und

50 c) das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom erneut mißt,
wobei die Unterschiede zwischen dem Membranpotential und dem Kaliumauswärtsstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.

34. Antikörper, der an das isolierte Kaliumkanalprotein nach den Ansprüchen 1 bis 4 bindet.

35. Antikörper, der an das Kaliumkanalprotein nach den Ansprüchen 1 bis 4 bindet, wobei das Kaliumkanalprotein Bestandteil eines Kaliumkanals nach den Ansprüchen 5 bis 7 ist.

55 36. Antikörper nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß er ein polyklonaler Antikörper ist.

37. Antikörper nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß er ein monoklonaler Antikörper ist.

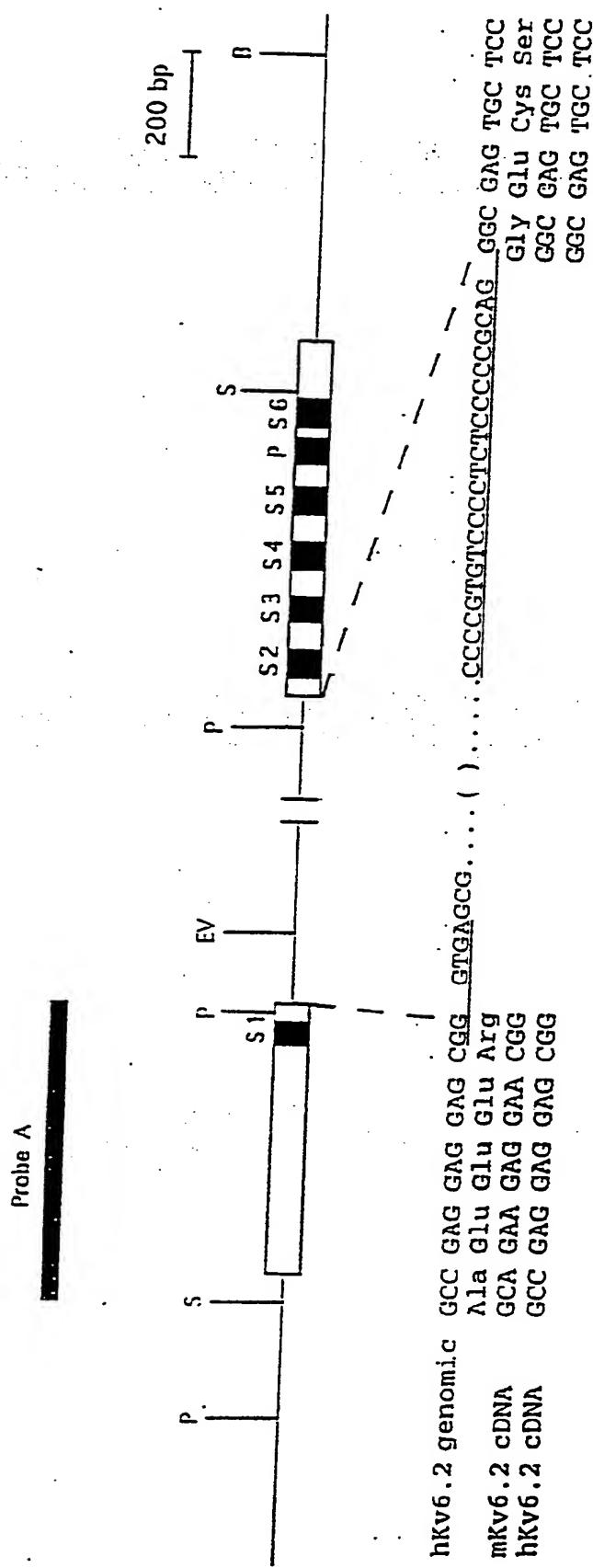
Hierzu 11 Seite(n) Zeichnungen

60

65

- Leerseite -

Figur 1 A



Figur 1 B

Figur 1 B (Forts. tzung)

Figure 1 C

MEWPWPCSPGGGGTRARHIV I INGGCRVRLAWAALARCPLARLERL 46
 RACRGHIDLLRVCDDYDVSRDEFDFDRSPCAFRATIVALLRACKLRLRGPCALAFRDEL A 106
 YWGTRIDEARLERCCLRRREEEAEARAGP^TERGAQGSPARALGPRGRILQRGRRRLRDV 166
 PKC
 VDNPIISGLAGKLEACVSYSFVAV^TAVGLCLSTMMPDIRAEEERGECSPKCRSLEFVLETVCV 226
 S1

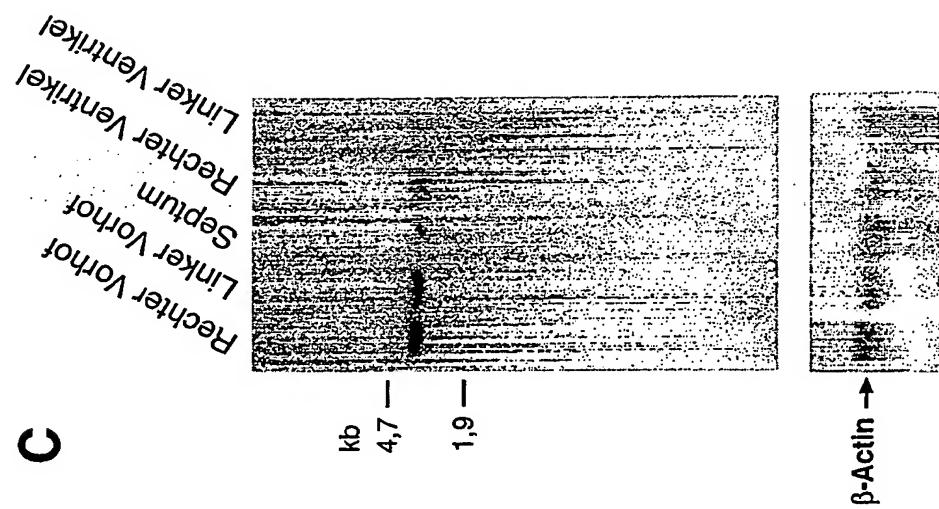
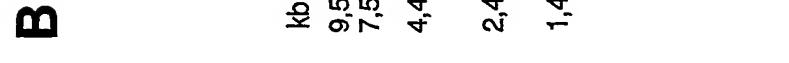
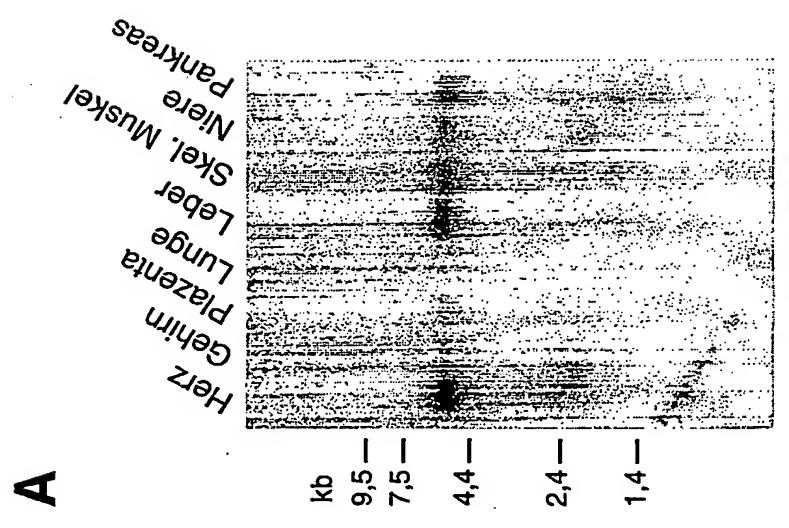
LIGARRDRFSSVUPASYYWWVVISSMTVYGDWVRSULPGOMVALLMAEPVNTSEII 406

1'FSRSYSSELKEQQQRRAASPEPALQEDSTIISIATATEDSSQGPDSAGLADDSDADLWVRAGER 466
CamK CamK

Figur 1 D

| % | rKv6.1 | rKv1.4 | rKv2.1 | rKv3.1 | rKv4.2 | rKv5.1 | rKv8.1 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| hKv6.2 | 62.0 | 35.2 | 39.2 | 38.0 | 34.0 | 34.0 | 38.8 |
| | | | | | | | |

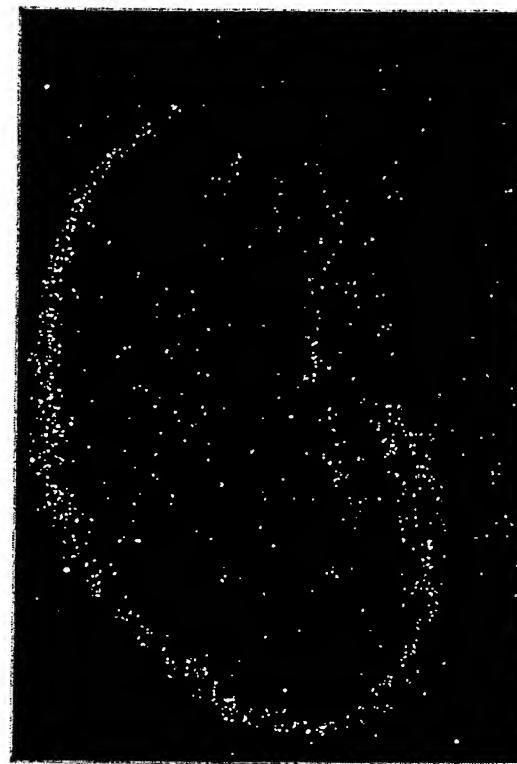
Figur 2



Figur 3 **Expression von Kv6.2 im Hippocampus**



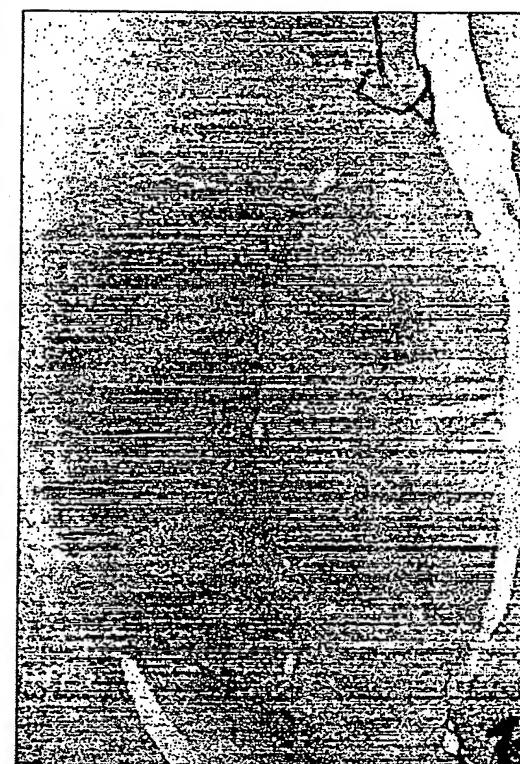
Kv6.2 antisense



Kv6.2 sense

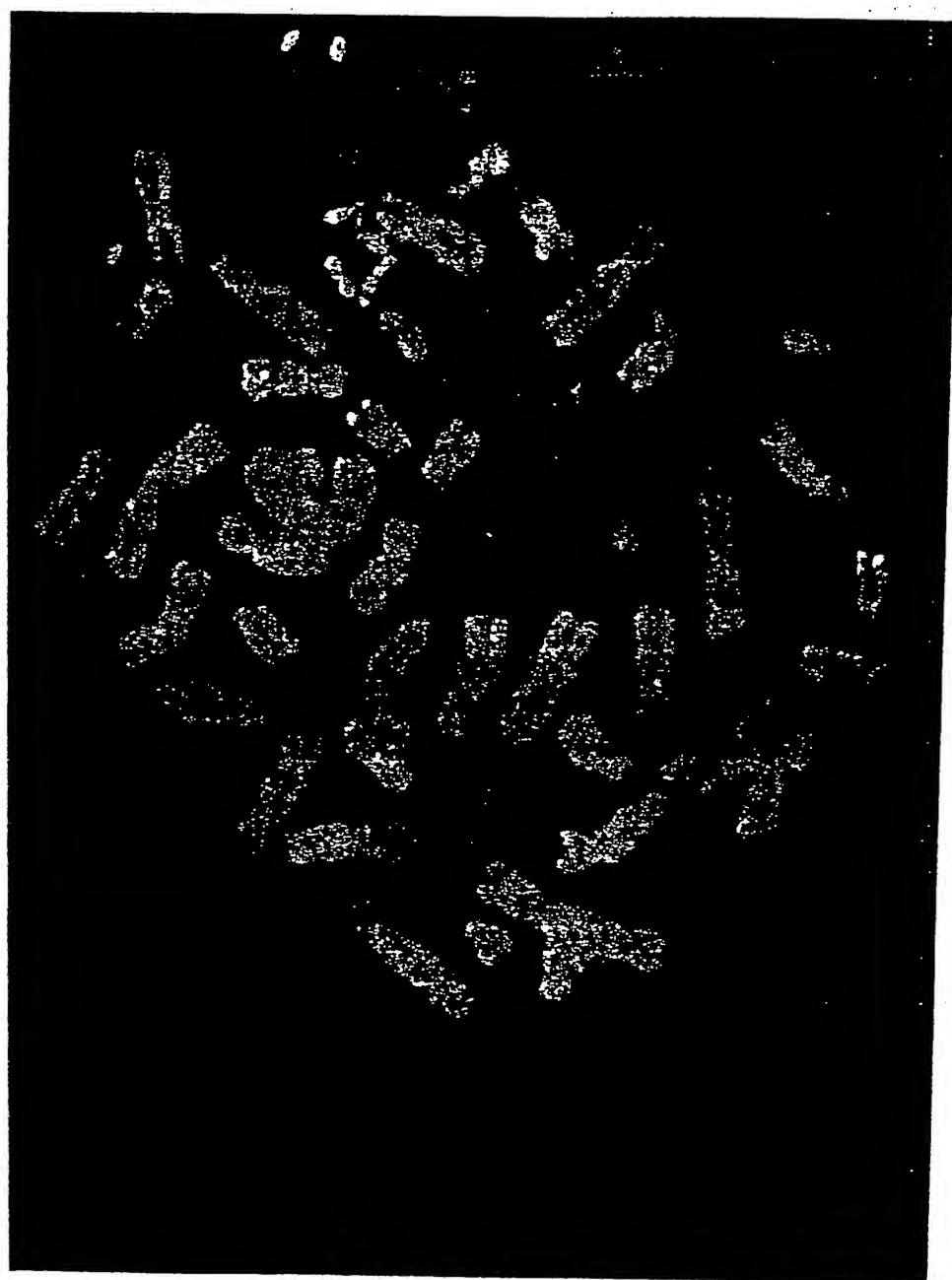


anti Kv6.2

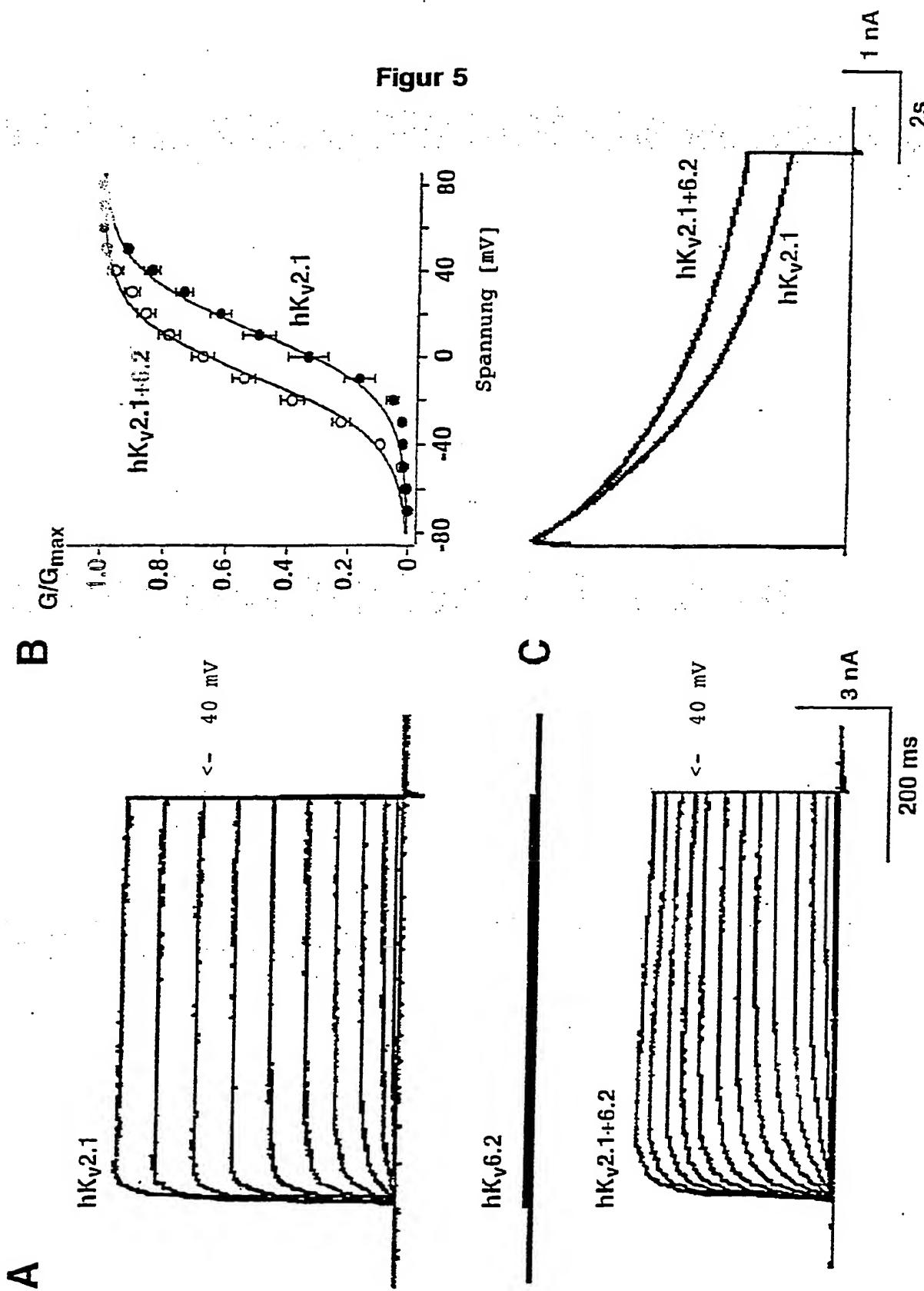


anti Kv6.2 + peptide

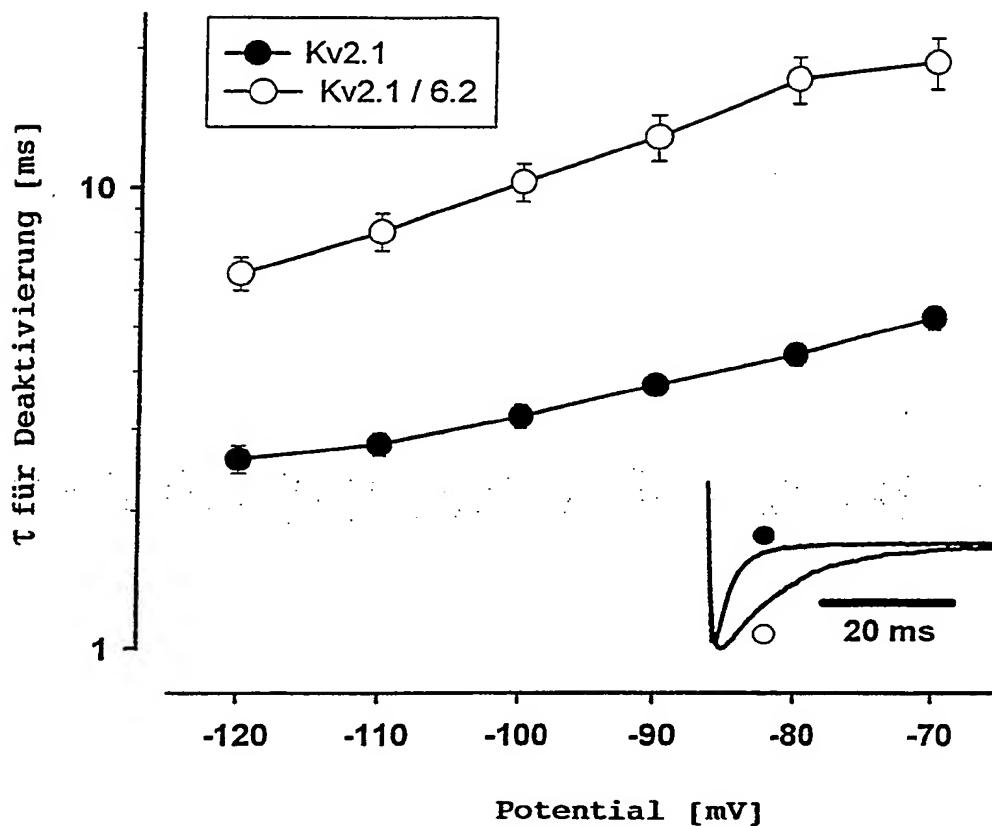
Figur 4



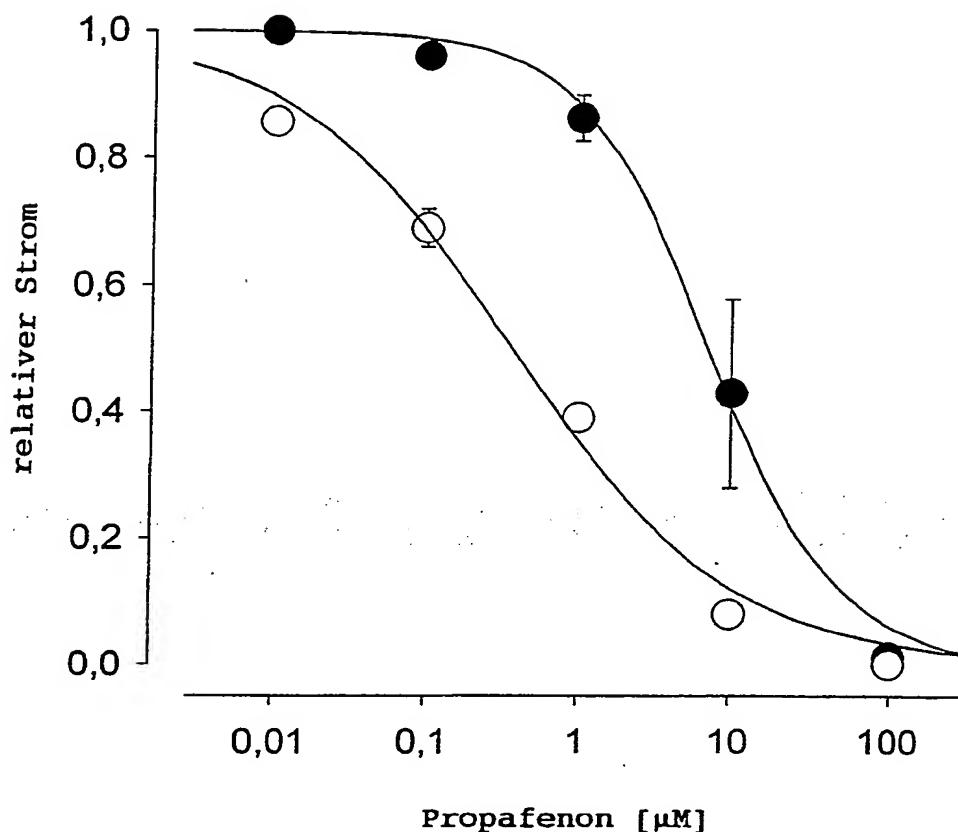
Figur 5



Figur 6



Figur 7



Kv2.1 $k=7,0 \pm 0,9$ $H=1,03 \pm 0,1$
Kv2.1/Kv6.2 $k=0,37 \pm 0,08$ $H=0,6 \pm 0,07$